SYNTHESEWEGE ZU PYROGLUTAMYLPEPTIDEN MIT TRH-VERWANDTER STRUKTUR

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Emanuel Pietrzik
aus Dresden

1977

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523707_0078

SYNTHESEWEGE ZU PYROGLUTAMYLPEPTIDEN MIT TRH-VERWANDTER STRUKTUR

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Emanuel Pietrzik
aus Dresden

1977

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung	23. Juni 1977
Dekan:	Prof. Dr. W. Zeil
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Voelter
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Bayer

MEINER FAMILIE

Die vorliegende Arbeit wurde mit Unterbrechungen in der Zeit von Februar 1974 bis März 1977 am Lehrstuhl für Organische Chemie I, Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen, Direktor Prof. Dr. E. Bayer, unter wissenschaftlicher Anleitung von Prof. Dr. W. Voelter angefertigt.

Herrn Prof. Dr. W. Voelter
danke ich herzlich für die Themenstellung, für sein stetes Interesse an der Arbeit und für viele wertvolle Hinweise während der Durchführung.

Herrn Prof. Dr. E. Bayer
sei für die freundliche Aufnahme an sein Institut und für die Benutzungserlaubnis von Großgeräten gedankt.

Der Evangelischen Studienstiftung Villigst e.V.
sei für die Verleihung eines Promotionsstipendiums gedankt.

Für die korrekte Aufnahme zahlreicher Spektren möchte ich Frl. Förstel (IR), Herrn R. Müller und Dr. K.-P. Zeller (MS), Herrn B. Meier und Herrn Dipl.-Chem. H. Horn (^{13}C-NMR) danken. Herrn Wurmstich sei für die Durchführung der Elementaranalysen gedankt.
Herrn Thomas Härtner danke ich für die sorgfältige Ausführung präparativer Arbeiten im Labor.

Folgende Abkürzungen werden verwendet:

Gln = L-Glutamin
Glu = L-Glutaminsäure
Isogln = L-Isoglutamin
Phe = L-Phenylalanin
Pro = L-Prolin
Pyr = L-Pyroglutaminsäure

Boc = tert-Butyloxycarbonyl
Mbh = 4,4'-Dimethoxybenzhydryl
NPS = o-Nitrophenylsulfenyl
Tos = p-Toluolsulfonyl
Z = Benzyloxycarbonyl

OBzl = Benzylester
OEt = Äthylester
OMe = Methylester
ONSu = N-Hydroxysuccinimidester
OTCP = 2,4,5-Trichlorphenylester

AcOH = Eisessig
DMF = Dimethylformamid
EE = Essigsäureäthylester
EtOH = Äthanol
MeOH = Methanol
THF = Tetrahydrofuran
TFA = Trifluoressigsäure

PFT = Puls-Fourier-Transformation
TRH = Thyreotropin-'Releasing'-Hormon
DCC = Dicyclohexylcarbodiimid
HOBt = 1-Hydroxybenzotriazol
DCHA = Dicyclohexylamin (ammonium)
$CHCl_3$ = Chloroform
CH_2Cl_2 = Methylenchlorid

INHALTSVERZEICHNIS Seite

I. Einleitung 1

II. Allgemeiner Teil 2

1. Der Hormonbegriff 2
2. Problematik der Peptidsynthese 2
3. Kupplungs-Methoden 3
a) Säurechlorid-Methode 3
b) Azid-Methode 4
c) 'Mixed-Anhydrid'-Methode 4
d) Aktivester-Verfahren 5
e) Carbodiimid-Methode 5
4. Schutzgruppen 6
5. Synthese-Strategien der Phe^2-TRH-Hormon-Analoga 6
6. Diskussion der Ergebnisse 20

III. Experimenteller Teil

1. Geräte, Chemikalien, Schutzgruppen, Dünnschichtchromatographie 29
a) Geräte 29
b) Chemikalien 30
c) Schutzgruppen 30
d) Dünnschichtchromatographie 30
2. Aminosäurederivate 31
3. Synthese von L-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-prolinamid (Phe^2-TRH) 68
4. Synthese von L-Pyroglutamyl-L-prolyl-L-phenylalaninamid 76
5. Synthese von L-Phenylalanyl-L-prolyl-L-pyroglutaminsäureamid (über DCC/HOBt) 81
6. Synthese von L-Prolyl-L-phenylalanyl-L-pyroglutaminsäureamid (über DCC/HOBt) 81
7. Synthese von L-Phenylalanyl-L-pyroglutamyl-L-prolinamid (über DCC/HOBt,Azid-Methode) 83
8. Synthese von L-Phenylalanyl-L-pyroglutamyl-L-prolinamid (über Säurechlorid-/Azid-Methode) 84
9. Synthese von L-Prolyl-L-pyroglutamyl-L-phenylalaninamid (über ammoniakalische oder saure Cyclisierung) und möglicher Nebenprodukte 85

10. Synthese von L-Phenylalanyl-L-pyroglutamyl-L-prolinamid (über ammoniakalische und saure Cyclisierung) und möglicher Nebenprodukte 92
11. Synthese von L-Prolyl-L-phenylalanyl-L-pyroglutaminsäureamid (über ammoniakalische und saure Cyclisierung) und möglicher Nebenprodukte 96
12. Synthese von L-Phenylalanyl-L-prolyl-L-pyroglutaminsäureamid (über ammoniakalische und saure Cyclisierung) und möglicher Nebenprodukte 105

IV. Zusammenfassung 111

V. Literaturverzeichnis 113

I. Einleitung

Im Jahre 1971 berichten A.V.Schally [1] und R.Guillemin [2] annähernd gleichzeitig über die Isolierung und endgültige Strukturaufklärung des ersten Hypothalamus-"Releasing"-Hormons, das Thyreotropin-"Releasing"-Hormon (TRH). Es handelt sich bei diesem Hormon um ein Tripeptidamid mit der Primärstruktur L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-prolinamid (L-Pyr-L-His-L-Pro-NH_2), dessen physiologischer Effekt in der Stimulation der Ausschüttung von Thyreotropin (TSH) [3-7], Prolactin [8-12], sowie in geringerem Maße von Adrenocorticotropin (ACTH) [13] und Wachstumshormon (GH) [14,15] beruht.

Auf Grund seiner verhältnismäßig einfachen Struktur bot sich dieses "Releasing"-Hormon für Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen an, denn hierbei sollten Hormonwirkungsmechanismen noch am ehesten überschaubar sein. In den darauffolgenden drei Jahren wurden viele TRH-Derivate durch Änderung der Primärstruktur dargestellt. Eine umfassende Übersicht der bis 1975 hergestellten Hormonanaloga geben D.Gupta und W.Voelter[16].

Bei den durchgeführten Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen zeigte sich, daß Pyroglutaminsäure - eine Aminosäure, die außer bei den Hypothalamus-Hormonen nur noch selten in der Natur vorkommt,- und Prolinamid für die biologische Aktivität des Hormons dringend notwendig sind; Histidin dagegen läßt sich - zwar unter erheblichem Aktivitätsverlust - gegen andere Aminosäuren austauschen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, TRH-Analoga mit einem mittel- oder C-terminalen Pyroglutaminsäurerest herzustellen, da derartige Derivate bisher nicht beschrieben wurden. Die Struktur dieser Pyroglutamylpeptide soll spektroskopisch bewiesen werden. Nach der Synthese sollen die erhaltenen Hormonanaloga für Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen verwendet werden.

Da TRH (L-Pyr-L-His-L-Pro-NH_2) durch Kristallisation nicht zu reinigen ist, soll für die geplanten Synthesen das um-

kristallisierbare Phenylalanin^2-TRH als Stammverbindungen gewählt werden. Diese Substanz wurde bereits synthetisiert[17,18,19] und besitzt erhebliche biologische Aktivität. Bei der Darstellung von Phe^2-TRH sollen außerdem Möglichkeiten zur Optimierung der TRH-Synthese untersucht werden.

II. Allgemeiner Teil

1. Der Hormonbegriff

Mit zunehmender Erkenntnis der physiologischen Zusammenhänge im Säugetierorganismus war es erforderlich, den Begriff des Hormons immer wieder neu zu definieren.

Nach dem heutigen Wissensstand ist es sehr schwer, das Wort Hormon mit einem Satz zu definieren, der allen Gesichtspunkten Rechnung trägt.

Hormone sind hochspezifisch wirksame, körpereigene Substanzen verschiedener organisch-chemischer Stoffklassen, die durch Informationsübertragung an spezifischen Erfolgsorganen Stoffwechselabläufe induzieren oder hemmen. Sie sind nicht zu verwechseln mit Enzymen, da sie keine Stoffwechselvorgänge katalysieren; ebensowenig sind sie den Vitaminen gleichzusetzen, die ja bekanntlich nicht vom Körper selbst synthetisiert werden können.

2. Problematik der Peptidsynthese

Typisch für ein Peptid ist die Säureamidbindung zwischen der Carboxyl- und Aminogruppe zweier oder mehrerer Aminosäuren unter H_2O-Abspaltung.

Um bei der künstlichen, nicht enzymatischen Peptidsynthese Polykondensationen zu vermeiden, ist es erforderlich, alle funktionellen Gruppen, die an der Reaktion nicht teilnehmen sollen, spezifisch zu maskieren, sodaß z.B. nur die Carboxylgruppe der Aminosäure A mit der Aminogruppe der Aminosäure B reagieren kann; nur so lassen sich definierte Produkte erhalten. Wesentlich komplizierter wird es, wenn die Aminosäuren

zusätzliche Drittfunktionen enthalten. Meist müssen dann Schutzgruppen eingesetzt werden, die bis zum vollständigen Aufbau der Peptidkette am Molekül bleiben, folglich unter Abspaltungsbedingungen von α-Amino und Carboxy-Schutzgruppen stabil sein müssen. Eine Methode der Wahl wird es in solchen Fällen nicht geben; vielmehr wird die einzuschlagende Synthesestrategie von der Sequenz bestimmt werden.

Mechanistisch gesehen handelt es sich bei der Säureamidformation um eine bimolekulare nukleophile S_N2-Substitution nach einer Additions-Eliminierungsreaktion, die nicht von allein abläuft. Wichtigster Teilschritt dieser Reaktion ist die Anlagerung des Stickstoffs über sein freies Elektronenpaar an das positivierte Carboxyl-Kohlenstoffatom.

Die Amino-Komponente kann folglich nur als freie Base in die Reaktion eintreten. Früher postulierte Aminogruppen-Aktivierungen, wie z.B. die Anwendung von N-Carbonylaminosäureestern, laufen letztlich auf eine Carboxylgruppenaktivierung hinaus [20].

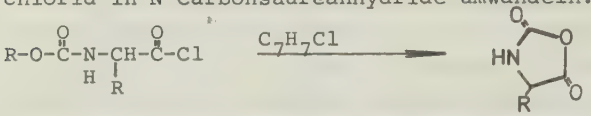
Alle Kupplungsvarianten beinhalten die Aktivierung der Carboxylgruppe; ihre Bereitschaft zur Addition der Aminogruppe wird umso größer sein, je näher man bei der Aktivierung den Grenzzustand eines Carboxy-Kations erreicht. Dabei soll die Synthese schonend ablaufen unter Beibehaltung der optischen Aktivität der eingesetzten Aminosäuren.

3. Kupplungs-Methoden

a) Säurechlorid-Methode

Diese Methode ist eines der ältesten Verfahren der Peptidsynthese. Es wurde bereits 1903 von E.Fischer [21] auf seine Verwendbarkeit untersucht. Unter Schotten-Baumann-Bedingungen setzt man N-α-geschützte Aminosäuren mit Aminosäure-(Peptid) estern(oder Amiden) und einem Mol Base in einem inerten Lösungsmittel um [22]. Das Verfahren wird heute kaum mehr angewendet, da sich Aminosäurechloride sehr leicht zersetzen. Bei Carbobenzoxy-geschützten Aminosäurechloriden ist zudem zu beachten, daß sie sich sehr leicht unter Abspaltung von Benzyl-

chlorid in N-Carbonsäureanhydride umwandeln.

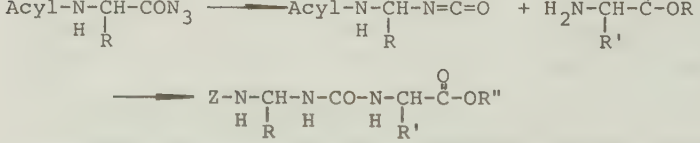


Zudem ist die Synthese höherer Peptide über Säurechloride problematisch. Peptidsäurechloride lassen sich zwar herstellen [23], jedoch kommt es häufig zur 1,3-Oxazolinon-(5)-Bildung und einem Angriff auf die Peptidbindung [24]

b) Azid-Methode

Diese Methode ist ebenfalls sehr alt [25]. Sie wird in modifizierter Form noch heute häufig angewendet, da sie praktisch racemisierungsfrei verläuft. Besonders geeignet ist sie zur Kupplung von Peptidfragmenten. Acylaminosäure (- peptid)ester werden mittels Hydrazin in das Hydrazid überführt, darauf mit Isoamyl (tert-Butyl)-nitrit in das kupplungsfähige Azid und meist ohne weitere Isolierung mit einem Aminosäure(peptid)ester umgesetzt. Von Vorteil ist bei dieser Methode, daß Drittfunktionen ungeschützt eingesetzt werden können.

Es sind jedoch bei Azidkupplungen auch Nebenprodukte - Harnstoffderivate - beschrieben worden, die sich häufig nur schwer von der gewünschten Sequenz abtrennen lassen [26]. Sie entstehen aus durch Curtinsumlagerung entstandenen Isocyanaten beim Umsatz mit der Aminokomponente.



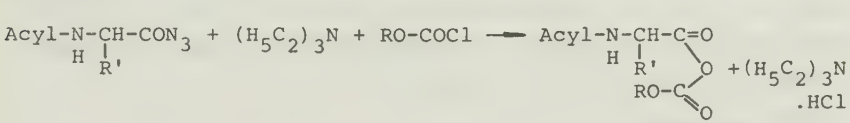
Außerdem ist die Bildung von Amiden aus dem Azid in wäßrigem Medium und die Nitrierung von Tyrosin und Tryptophan bekannt [27].

c) 'Mixed-Anhydrid'-Methode

Bei diesem Verfahren wird die Aktivierung der Carboxylgruppe erreicht, indem man das N-Acyl-Aminosäure-Salz einer tertiären Base in einem inerten Lösungsmittel bei tiefer Temperatur mit

einem O-Alkyl-kohlensäurechlorid (Chlorameisensäure-alkylester) umsetzt [28].

Während Chlorameisensäure-methyl(phenyl)ester nur unbefriedigende Ergebnisse liefern[29], haben sich Äthyl- [29] und Isobutylester [30] besonders bewährt. Das bei dieser Reaktion entstehende gemischte Anhydrid ist sehr reaktiv und erlaubt Peptidkupplungen in hohen Ausbeuten unter Wahrung der optischen Reinheit [31].



d) Aktivester-Verfahren

Hier nutzt man die Aminolysegeschwindigkeit eines N-Acyl-Aminosäureesters aus, die in der Reihe vom Äthyl- und Benzylester über Vinylester zum Arylester zunimmt. Zusätzlich steigern läßt sie sich durch weitere elektronenziehende Substituenten am aromatischen Ring. Besonders günstige Verhältnisse liegen vor, wenn sich -I und -M-Effekt addieren, wie es zum Beispiel beim p-Nitrophenylester der Fall ist.

Zu den gebräuchlichsten Aktivestern zählen der p-Nitrophenyl- [32], 2,4,5-Trichlorphenyl- [33], Pentachlorphenyl- [34] und in neuerer Zeit auch der N-Hydroxysuccinimid-Ester [35].

e) Carbodiimid-Methode

Dieses Verfahren geht auf J.C.Sheehan und G.W.Hess [36] zurück. Man nutzt hierbei die hohe Reaktivität der Carbodiimide. Als 'Standard'-Carbodiimid für organische Lösungsmittel hat sich Dicyclohexylcarbodiimid bewährt.

Der erste Teilschritt der Reaktion des Dicyclohexylcarbodiimids mit einer N-Acyl-Aminosäure (Peptid) beinhaltet die Bildung eines O-Acyl-Harnstoffderivats, das durch den nucleophilen Angriff der Aminokomponente in das gewünschte Peptid und Dicyclohexylharnstoff gespalten wird. Als mögliche Nebenreaktion

wird häufig die Umlagerung des O-Acyl-Harnstoffderivats in das stabile, nicht mehr acylierende N-Acyl-Harnstoffderivat beobachtet, das häufig nur noch schwer von der erstrebten Peptidsequenz abzutrennen ist. Da bei Diimid-Kupplungen häufig der teilweise Verlust der optischen Aktivität festgestellt wurde, verbesserten E.Wünsch [37] und König und Geiger [38] die Methode dahingehend, daß sie dem Reaktionsansatz äquimolare Mengen N-Hydroxysuccinimid bzw. N-Hydroxybenzotriazol zusetzten. Dadurch entstehen aus dem O-Acyl-Harnstoff die entsprechenden Aktivester, die sich praktisch racemisierungsfrei mit der Aminokomponente umsetzen.

4. Schutzgruppen

Unter der großen Anzahl von beschriebenen Schutzgruppen sind nur wenige, die allgemein gebräuchlich sind [39]. Die meisten kommen nur bei ganz bestimmten Syntheseproblemen zum Einsatz.

In der vorliegenden Arbeit werden nur die Benzyloxycarbonyl(Z)-[40], die tert-Butyloxycarbonyl(Boc)-[41], die O-Nitrophenylsulfenyl(NPS)- [42] und die 4-Toluolsulfonylschutzgruppe (TOS) [43] als Aminoschutzgruppen verwendet. Die beiden ersteren leiten sich von der Urethanstruktur ab und sind säurelabil. Die Z-Gruppe läßt sich mittels HBr/AcOH oder Hydrierung entfernen, die Boc-Gruppe wird durch 1,2 n HCl/AcOH oder TFA/CH_2Cl_2 schonend abgespalten. Die NPS-Gruppe ist bereits nach wenigen Minuten bei Raumtemperatur mit HCl/Äther oder HCl/EE abspaltbar, während die TOS-Gruppe nur mit Natrium in siedendem Ammoniak glatt zu entfernen ist; allerdings werden auch hier etliche Nebenreaktionen beschrieben [43]. Als Carboxylschutzgruppen werden Methyl-, Äthyl-, Benzyl- und Phenylester eingesetzt, die sich mit Ausnahme des Phenylesters [43] alkalisch glatt verseifen lassen.

5. Synthese-Strategien der PHe^2-TRH-Hormon-Analoga

Alle im nachfolgenden Teil erwähnten Aminosäurederivate und beschriebenen Peptidsynthesen sind, wenn möglich, mit Massen-, IR- und ^{13}C-NMR-Spektroskopie überprüft worden. Auf Grund der Fülle des spektroskopischen Datenmaterials werden die

Spektren mit Ausnahmen im experimentellen Teil abgebildet, bzw. deren Zahlenwerte aufgeführt.

Synthese von Phe^2-TRH und seiner Strukturanaloga

Synthese von L-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-prolinamid (Phe^2-TRH)

Am Phe^2-TRH soll im Hinblick auf die Synthese der übrigen Strukturanaloga - sofern die Ergebnisse überhaupt übertragbar sind - die optimale Synthesestrategie erarbeitet werden.

Abweichend zu den meisten TRH-Synthesen der Literatur (von Merrifield-Synthesen abgesehen) werden in der vorliegenden Arbeit die Bedingungen so gewählt, daß die Pyroglutaminsäure, sofern sie nicht in Position 2 steht, oder eine ihrer Vorstufen gegen Ende der Synthese in das Molekül eingebaut wird.

Synthesestrategie I wird im nachfolgenden Syntheseschema veranschaulicht:

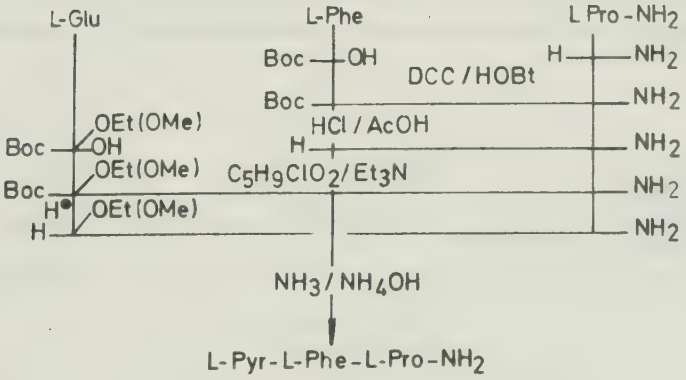


Abb. 1: Syntheseschema von L-Pyr-L-Phe-L-Pro-NH_2.

Zunächst werden Boc-L-Phenylalanin und L-Prolinamid zum entsprechenden Dipeptid gekuppelt, deblockiert und anschließend über die 'Mixed-Anhydrid'-Methode mit dem Boc-L-Glutaminsäure-γ-äthylester (methylester) zum geschützten Tripeptid umgesetzt. Nach Abspalten der Aminoschutzgruppe mittels Trifluoressigsäure behandelt man das Peptid für 24h bei Raumtemperatur mit flüssigem Ammoniak oder konzentrierter wäßriger Ammoniaklösung und kristallisiert aus Äthanol/Äther. Mittels einer Referenzsubstanz läßt sich die neu entstandene Verbindung als L-Pyr-L-Phe-L-Pro-NH_2 identifizieren; sie ist dünnschichtchromatographisch in zwei Laufmittelsystemen sauber.

Synthesestrategie II

Wie das Syntheseschema veranschaulicht, wird ebenfalls vom Dipeptid L-Phenylalanyl-L-prolinamid ausgegangen, das nach DCC/HOBt-Kupplung mit Z-(Mbh)-L-Glutamin zum Tripeptidamid Z-(Mbh)-L-Glutaminyl-L-phenylalanyl-L-prolinamid umgesetzt wird. Beide Schutzgruppen lassen sich durch Kochen in Trifluoressigsäure/Anisol (9:1) abspalten, wobei sich gleichzeitig der Ringschluß zur aminoendständigen Pyroglutaminsäure vollzieht [44].

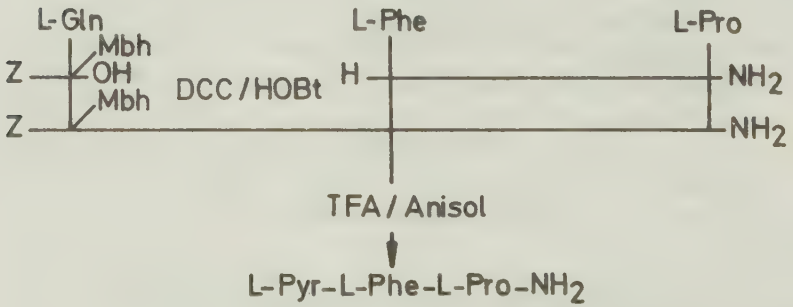


Abb. 2: Syntheseschema von L-Pyr-L-Phe-L-Pro-NH_2.

Die folgenden drei Strategien unterscheiden sich nur in der Wahl des zur Reaktion eingesetzten Pyroglutaminsäurederivats.

Bei den Synthesewegen III und IV wird jeweils von einem Aktivester ausgegangen. Bei Verwendung von L-Pyroglutaminsäure-2,4,5-trichlorphenylester erhält man sofort das Endprodukt, jedoch erweist sich die Reinigung als ziemlich aufwendig, da das entstandene Trichlorphenol nur schwer quantitativ abzutrennen ist. Setzt man Z-L-Pyroglutaminsäure-N-hydroxysuccinimidester zur Synthese ein (Strategie IV), muß man einen Syntheseschritt mehr durchführen, jedoch ist die Aufarbeitung des Rohprodukts erleichtert, da Hydroxysuccinimid gut wasserlöslich ist. Versuche, L-Pyroglutaminsäure-N-hydroxysuccinimidester analog dem entsprechenden Trichlorphenylester darzustellen, um die anschließende Hydrierung zu umgehen, sind bisher fehlgeschlagen.

Bei der letzten Strategie (V) wird Z-L-Pyroglutaminsäure über DCC/HOBt-Kupplung mit L-Phenylalanyl-L-prolinamid zum geschützten Tripeptidamid umgesetzt. Dabei ist auch untersucht worden, ob die Synthese des Dipeptidamids L-Phenylalanyl-L-prolinamid günstiger verläuft, wenn man von Z-L-Phenylalanin ausgeht und anschließend hydriert. Dies scheint nicht der Fall zu sein; zwar ist die prozentuale Ausbeute nach dieser Strategie höher, jedoch war die Molarität des Versuchsansatzes weitaus geringer.

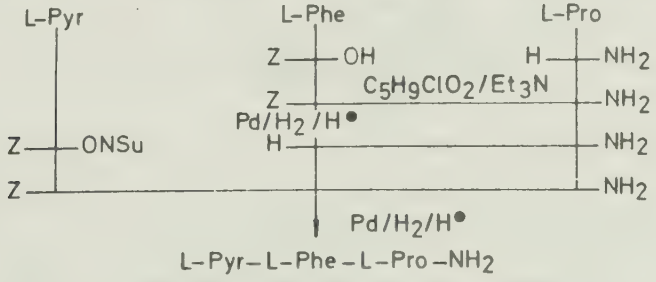


Abb. 3: Syntheseschema von L-Pyr-L-Phe-L-Pro-NH_2.

Nach Abhydrieren der Schutzgruppe kristallisiert man aus absolutem Äthanol/Äther. Das erhaltene Produkt ist dünnschichtchromatographisch sauber.
Betrachtet man die physikalischen Daten, (vgl.im exp.Teil), so kann man zumindest für das Phe^2-TRH sagen, daß für Synthesen die Strategien IV und V in Frage kommen. Interessant ist

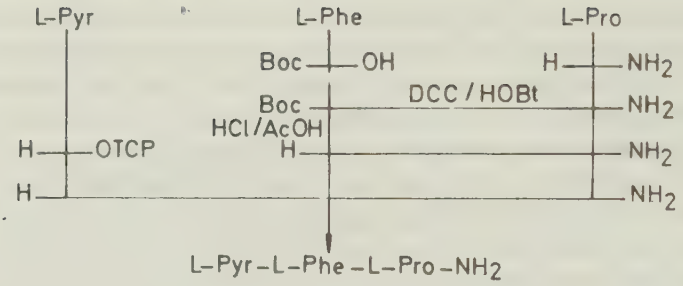


Abb. 4: Syntheseschema von L-Pyr-L-Phe-L-Pro-NH_2.

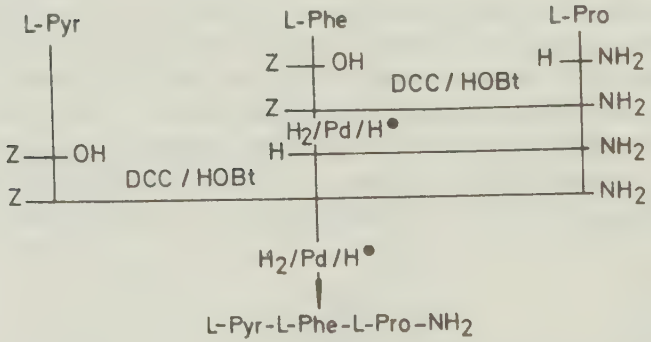


Abb. 5: Syntheseschema von L-Pyr-L-Phe-L-Pro-NH_2.

weiterhin die Tatsache, daß das Phe^2-TRH, dargestellt nach Strategie II, weitgehend racemisiert war. Dies kann eindeutig anhand des Drehwertes und ^{13}C-spektroskopisch nachgewiesen werden.Die Abbildungen 6 u.7 zeigen das ^{13}C-Spektrum des racemisierten Phe^2-TRH im Vergleich zu einem optisch einwandfreien Produkt, dargestellt nach Strategie V. Dennoch soll L-Pyr-L-Pro-L-Phe-NH_2 nicht nur nach den oben beschriebenen Strategien IV und V dargestellt werden, sondern auch noch

nach den Synthesewegen II und III, um zu überprüfen, ob analoge Ergebnisse gefunden werden.

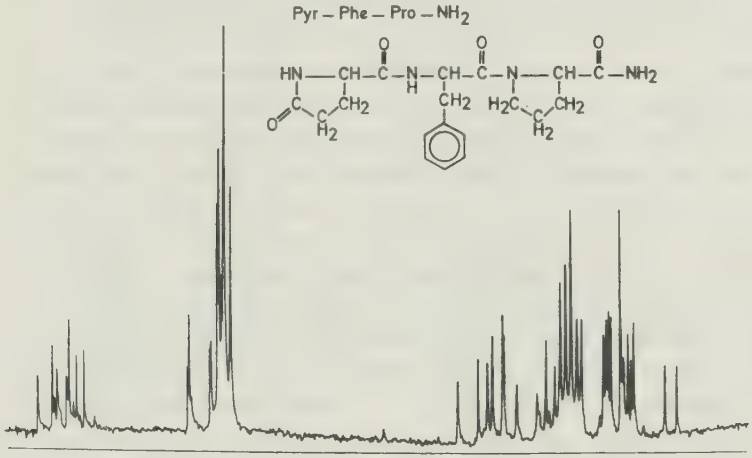


Abb. 6: PFT-^{13}C-$\{^{1}H\}$-NMR-Spektrum von teilweise racemisiertem PHE^2-TRH, dargestellt nach Strategie II.

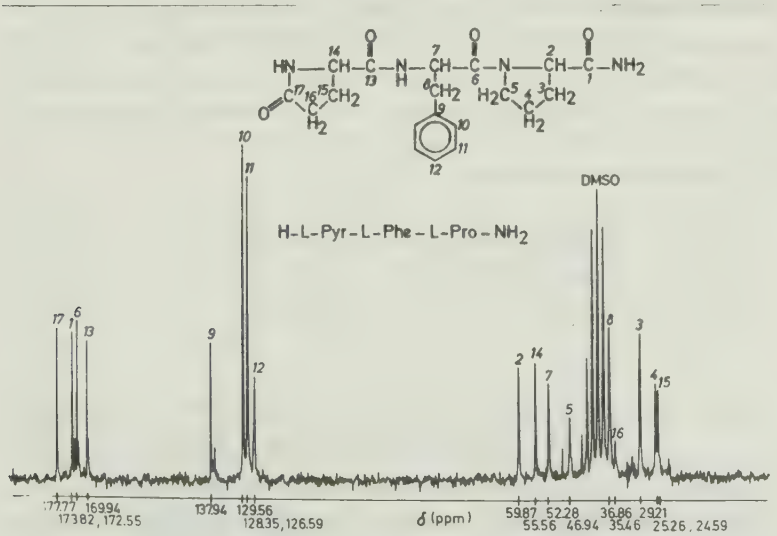


Abb. 7: PFT-^{13}C-$\{^{1}H\}$-NMR-Spektrum von optisch reinem Phe^2-TRH, dargestellt nach Strategie V.

Synthese von L-Pyroglutamyl-L-prolyl-L-phenylalaninamid

Zunächst wird das Dipeptidamid L-Prolyl-L-phenylalaninamid nach zwei Varianten dargestellt. Dabei hat sich gezeigt, daß die 'Mixed-Anhydrid'-Kupplung von Z-L-Prolin mit L-Phenylalaninamid im vorliegenden Fall bessere Ausbeuten erbringt als die DCC/HOBt Kupplung von Boc-L-Prolin mit L-Phenylalaninamid. Beide Produkte sind in ihren physikalischen Daten identisch und dünnschichtchromatographisch sauber. Das freie Dipeptidamid wird dann entweder mit Z-(Mbh)-L-Glutamin (Strategie II), L-Pyroglutaminsäure-2,4,5-trichlorphenylester (Strategie III), Z-L-Pyroglutaminsäure-N-hydroxysuccinimidester (Strategie IV) oder mit Z-L-Pyroglutaminsäure gekuppelt. Da die Syntheseschemata abgesehen von der Reihenfolge von Prolin und Phenylalanin identisch sind mit den oben aufgeführten, werden sie nicht abgebildet. Auch bei den Synthesen von L-Pyr-L-Pro-L-Phe-NH_2 zeigt sich, daß die Strategien IV und V die besten Ergebnisse liefern, wobei Strategie V vorzuziehen ist. Bei Strategie II wird ebenfalls der hohe Anteil an racemischem Produkt beobachtet, wie bereits beim Phe^2-TRH, was besagt, daß die Ursache in den Reaktionsbedingungen zu suchen ist. Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse soll bei den Synthesen der restlichen Analoga vorwiegend über DCC/HOBt und 'Mixed-Anhydrid' gekuppelt werden.

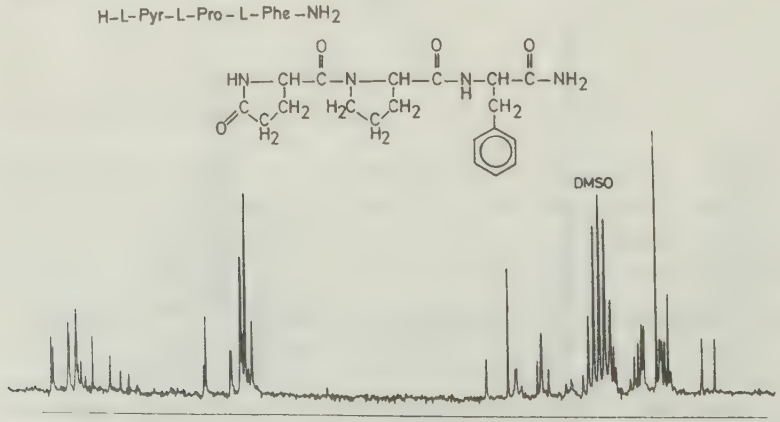


Abb.8: PFT-^{13}C-$\{^1H\}$-NMR-Spektrum von teilweise racemisiertem L-Pyr-L-Pro-L-Phe-NH_2.

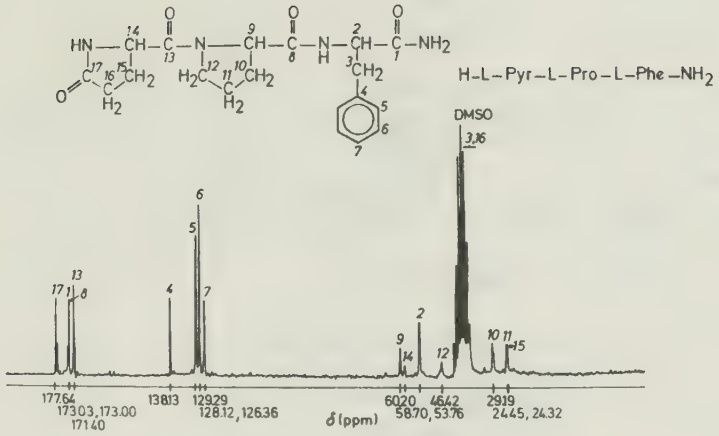


Abb. 9: PFT-^{13}C-$\{^{1}H\}$-NMR-Spektrum von optisch reinem L-Pyr-L-Pro-L-Phe-NH_2.

Synthese von L-Phenylalanyl-L-prolyl-L-pyroglutaminsäureamid und L-Prolyl-L-phenylalanyl-L-pyroglutaminsäureamid

Wie nachfolgendes Syntheseschema veranschaulicht, wird zunächst Boc-L-Phenylalanin mit L-Prolinmethylester, bzw. Boc-L-Prolin mit L-Phenylalaninmethylester gekuppelt. Nach Verseifung zur freien Dipeptidsäure soll L-Pyroglutaminsäureamid über DCC/HOBt gekuppelt werden. Durch Behandeln des geschützten Tripeptidamids mit Trifluoressigsäure in Methylenchlorid gewinnt man das Trifluoracetat des jeweiligen TRH-Analogons, das mit wäßrigem Ammoniak aus seinem Salz freigesetzt wird.

Synthese von L-Phenylalanyl-L-pyroglutamyl-L-prolinamid und L-Prolyl-L-pyroglutamyl-L-phenylalaninamid

Boc-L-Phenylalanin bzw. Boc-L-Prolin sollen mit Pyroglutaminsäureäthylester mittels DCC/HOBt zum vollgeschützten Dipeptid gekuppelt werden. Dieses wird mit Hydrazin zum Hydrazid umge-

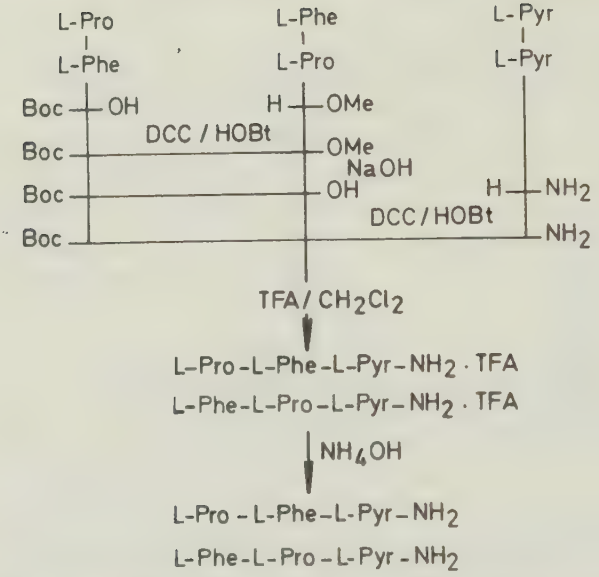


Abb. 10: Syntheseschema von L-Pro-L-Phe-L-Pyr-NH_2 und seinem Stellungsisomeren.

setzt und über eine Azid-Kupplung mit Prolin- bzw. Phenylalaninamid verknüpft. Nach Abspalten der Boc-Gruppe mit Trifluoressigsäure in Methylenchlorid setzt man das TRH-Analogon mit wäßrigem Ammoniak aus seinem Salz frei.

Bei der Durchführung der geplanten Synthesen hat sich gezeigt, daß Pyroglutaminsäure sich mit DCC/HOBt über den Lactamstickstoff nicht mehr kuppeln läßt, da seine Basizität durch die benachbarte Carbonylfunktion zu sehr beeinträchtigt ist. Auch bei Verwendung von Trichlorphenyl-Aktivestern unter HOBt-Katalyse [45], sowie Einsatz von Chlorameisensäureisobutylester ließen sich die gewünschten Sequenzen nicht darstellen. Daher wurde ein weiterer Versuch unternommen, indem Z-L-Phenylalaninchlorid mit Pyroglutaminsäureäthylester bzw. -amid in absolutem Benzol umgesetzt worden ist. Als Base verwendet man äquimolar N-Äthylmorpholin. Nach herkömmlicher Aufarbeitung

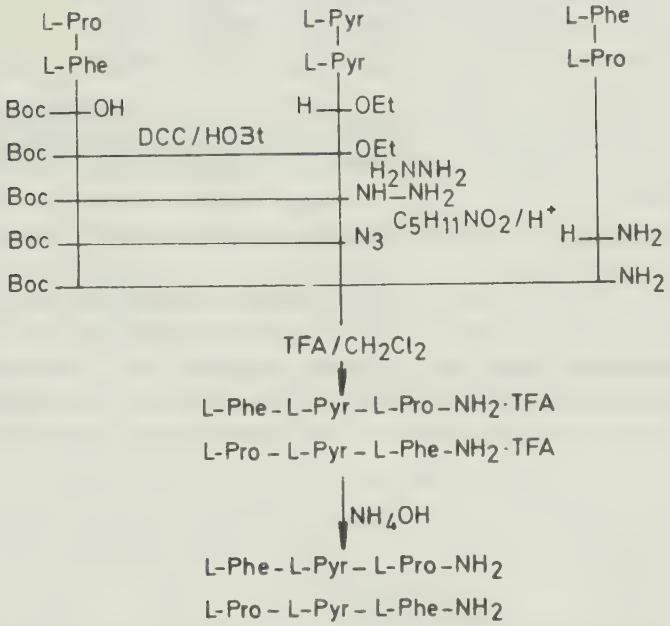


Abb. 11: Syntheseschema von L-Phe-L-Pyr-L-Pro-NH_2 und seinem Stellungsisomeren.

erhält man ein Öl, das im Dünnschichtchromatogramm neben Resten der Ausgangsverbindungen (Z-L-Phe-OH, Pyr-NH_2 (OEt), N-Äthylmorpholinhydrochlorid) noch drei weitere unbekannte Produkte ungefähr im Verhältnis 1:1:2 zeigt.

Da auch diese Strategie nicht zum Erfolg geführt hat, war es notwendig, für die vier Analoga mit mittel-, bzw. carboxylendständiger Pyroglutaminsäure völlig neue Synthesekonzepte zu entwickeln. Es bietet sich an, Glutaminsäure- oder Glutaminderivate einzusetzen und zu versuchen, diese im Molekülverband über saure oder alkalische Katalyse zur Pyroglutaminsäure zu cyclisieren. Derartige Synthesen sind aus der Literatur für aminoendständige Pyroglutaminsäure bekannt [44,46], außerdem ist die Cyclisierung von monomerem L-Glutaminsäure-γ-äthylester zu Pyroglutaminsäure durch NH_3-Katalyse beschrieben;

L-Glutaminsäurediäthylester läßt sich analog zum Pyroglutaminsäureamid cyclisieren [47]. Im Molekülverband sind derartige Ringschlußreaktionen bisher nicht beschrieben worden.

Synthese von L-Prolyl-L-phenylalanyl-L-pyroglutaminsäureamid, L-Phenylalanyl-L-prolyl-L-pyroglutaminsäureamid und möglicher Nebenprodukte

Für alkalische Cyclisierungsbedingungen wird folgende Synthesestrategie eingeschlagen:
Boc-L-Prolin wird mit DCC/HOBt an L-Phenylalaninmethylester gekuppelt. Nach Verseifung zur freien Säure kuppelt man mit L-Glutaminsäuredimethylester (äthylester) über DCC/HOBt zur Vorstufe Boc-L-Pro-L-Phe-L-Glu(OMe)-OMe, die nach Abspalten der Boc-Gruppe alkalisch durch Einwirken von NH_3-Lösung (conc.) cyclisiert werden soll.

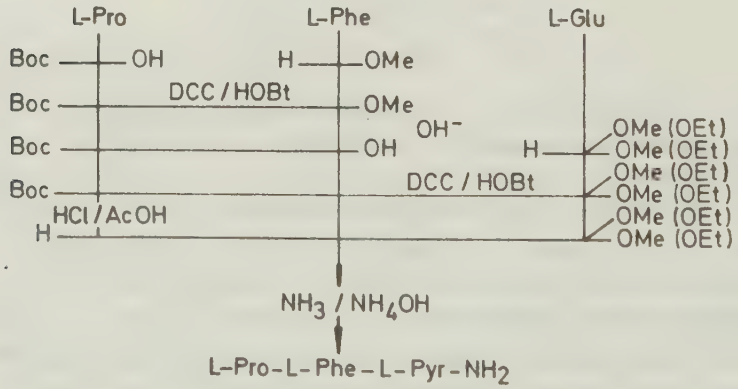


Abb. 12: Syntheseschema von L-Pro-L-Phe-L-Pyr-NH_2.

Dabei sind folgende Nebenprodukte denkbar, wenn Amidierung und Cyclisierung nicht quantitativ verlaufen:
1) L-Pro-L-Phe-L-Isogln-OMe, 2) L-Pro-L-Phe-L-Gln-NH_2,
3) L-Pro-L-Phe-L-Gln-OMe.

Zur eindeutigen Identifizierung der gewünschten Pyroglutamylsequenz werden die drei möglichen Nebenprodukte durch gezielte Synthese hergestellt und bis zum geschützten Tripeptid spektroskopisch und physikalisch charakterisiert. Der Vergleich mit dem Cyclisierungsprodukt erfolgt dünnschichtchromatographisch nach Abspalten der Boc-Gruppe und Neutralisation mit conc. Ammoniak. Alle drei Peptide werden nicht isoliert. Peptid 1 und 3 erhält man, indem man Boc-L-Pro-L-Phe-OH mit L-Isoglutaminmethylester nach der DCC/HOBt-Methode, bzw. mit L-Glutaminmethylester nach der 'Mixed-Anhydrid'-Methode kuppelt und darauf die Aminoschutzgruppe abspaltet. Peptid 2 wird durch Kuppeln der aminogeschützten Dipeptidsäure mit L-Glutaminamid über DCC/HOBt-Kondensation und anschließender Abspaltung der Boc-Gruppe mittels TFA/CH_2Cl_2 erhalten.

Eine weitere Möglichkeit zur Synthese von L-Pro-L-Phe-L-Pyr-NH_2 bietet sich an, wenn man anstelle des Glutaminsäurediesters L-Isoglutaminmethylester verwendet. Dadurch wird die Amidfunktion des gewünschten Pyroglutaminpeptids bereits vorgegeben.

Für diesen Fall sind bei unvollständigem Reaktionsablauf nur die N-α-ungeschützte Ausgangsverbindung und Peptid 2 (siehe oben) als Nebenprodukte zu erwarten.

Wählt man saure Cyclisierungsbedingungen (HF oder TFA), kann man obige Synthesestrategie beibehalten; man setzt lediglich L-Isoglutaminbenzylester als carboxylendständiges Derivat ein. Als Nebenprodukt wäre L-Pro-L-Phe-L-Isogln-OH zu erwarten.

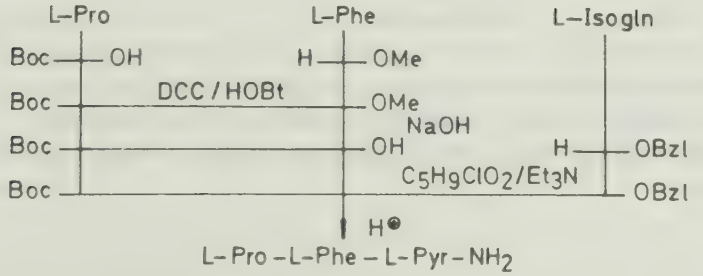


Abb.13: Syntheseschema von L-Pro-L-Phe-L-Pyr-NH_2.

Die Darstellung dieses möglichen Nebenproduktes erfolgt durch Deblockierung und anschließende Verseifung des vollgeschützten Peptids Boc-L-Pro-L-Phe-L-Isogln-OMe.

Eine weitere Möglichkeit bestünde darin, saure Cyclisierungsbedingungen mit nachfolgender Amidierung zu kombinieren. Dabei hat man die Auswahl zwischen einem Glutamin- und einem Glutaminsäurederivat, das zur Cyclisierungsreaktion eingesetzt werden kann. Nachfolgendes Schema veranschaulicht den Verlauf der Synthese:

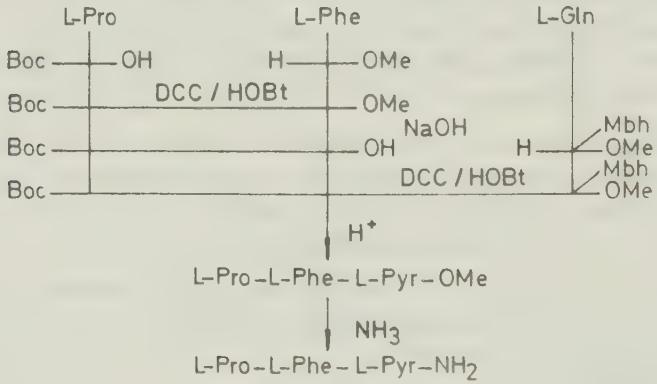


Abb. 14: Syntheseschema von L-Pro-L-Phe-L-Pyr-NH_2 über kombinierte saure und ammoniakalische Bedingungen.

Nach der DCC/HOBt-Methode synthetisiert man das Dipeptid Boc-L-Pro-L-Phe-OMe, verseift und kuppelt darauf analog 4,4'-Dimethoxybenzhydryl-L-Glutaminmethylester oder L-Glutaminsäure-γ-benzyl-α- methylester nach der 'Mixed-Anhydrid'-Methode an die freie Dipeptidsäure. Zur Cyclisierung behandelt man das Tripeptid zuerst entweder mit Fluorwasserstoff oder Trifluoressigsäure und überführt es dann durch Rühren in NH_3 (conc) ins Amid.

Die Synthesen des Stellungsisomeren L-Phe-L-Pro-L-Pyr-NH_2 sowie der möglichen Nebenprodukte wurden entsprechend durchgeführt.

Synthese von L-Prolyl-L-pyroglutamyl-L-phenylalaninamid und L-Phenylalanyl-L-pyroglutamyl-L-prolinamid.

Auch hier hat man die Möglichkeit, entweder ein Glutamin- oder Glutaminsäurederivat zur Cyclisierung einzusetzen. Für alkalische Bedingungen (NH_3) setzt man Glutaminsäure-γ-methyl(äthylester) ein, für saures Milieu (HF oder TFA) Glutaminsäure-γ-benzylester, bzw. 4,4'-Dimethoxybenzhydryl-L-glutaminmethylester. Im Falle der Glutaminsäure-γ-ester werden die entsprechenden Dipeptide durch Kupplungen von Boc-L-Prolin oder Boc-L-Phenylalanin nach der 'Mixed-Anhydrid'-Methode, bzw. durch Einsatz der Boc-Prolin- und Boc-Phenylalanin-Aktivester synthetisiert. Die jeweiligen Tripeptide werden nach der 'Mixed-Anhydrid'-Methode erhalten.

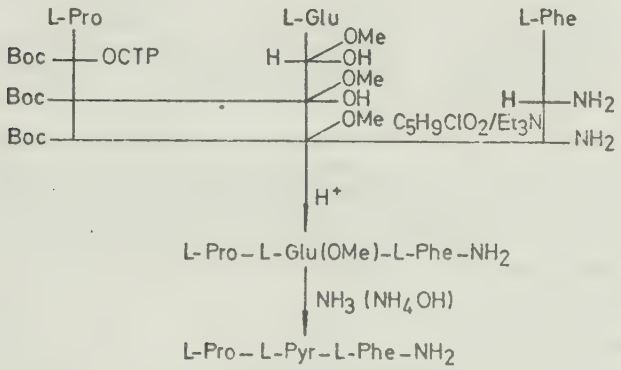


Abb. 15: Syntheseschema von L-Pro-L-Pyr-L-Phe-NH_2

Bei Verwendung des Glutaminderivates werden die Dipeptide Boc-L-Pro-L-Gln(Mbh)-OMe und Boc-L-Phe-L-Gln(Mbh)-OMe nach der DCC/HOBt-Methode dargestellt. Nach Verseifen zur freien Säure kuppelt man ebenfalls über DCC/HOBt das entsprechende carboxylendständige Aminosäurederivat zum cyclisierbaren Tripeptid.

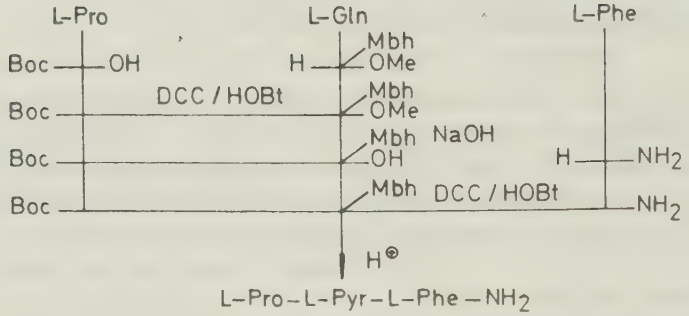


Abb.16: Syntheseschema von L-Pro-L-Pyr-L-Phe-NH_2 über 4,4'-Dimethoxybenzhydryl-L-glutaminmethylester.

Zur alkalischen Cyclisierung deblockiert man die Tripeptide Boc-L-Pro-L-Glu(OMe)-L-Phe-NH_2 und Boc-L-Phe-L-Glu(OMe)-L-Pro-NH_2 oder die entsprechenden Äthylester mit Trifluoressigsäure und rührt für 24 Stunden bei Raumtemperatur in conc. NH_3.

Boc-L-Pro-L-Glu(OBzl)-L-Phe-NH_2, Boc-L-Phe-L-Glu(OBzl)-L-Pro-NH_2, Boc-L-Pro-L-Gln(Mbh)-L-Phe-NH_2 und Boc-L-Phe-L-Gln(Mbh)-L-Pro-NH_2 werden zur sauren Cyclisierung entweder in flüssigem Fluorwasserstoff bei Raumtemperatur oder mit Trifluoressigsäure unter Rückfluß behandelt.

6. Diskussion der Ergebnisse

Bei den Versuchen, die gewünschten Pyroglutamylpeptide über ammoniakalische Katalyse darzustellen, konnten lediglich die entsprechenden Amide, Diamide oder gemischten Ester/Amide nachgewiesen werden; die dünnschichtchromatographische Interpretation der Reaktionsansätze erwies sich als verhältnismäßig einfach.

Während beim Behandeln von L-Pro-L-Phe-L-Glu(OMe)-OMe.TFA mit NH_3 (conc.) neben beträchtlichen Mengen des Ausgangsproduktes das Diamid H-L-Pro-L-Phe-L-Gln-NH_2 und das Ester-Amid L-Pro-L-Phe-L-Gln-OMe gefunden wurden,entstand unter gleichen Bedingungen

aus L-Pro-L-Phe-L-Glu(OEt)-OEt.TFA nahezu quantitativ das Diamid L-Pro-L-Phe-L-Gln-NH_2.(Zu den Referenzpeptiden H-L-Pro-L-Phe-L-Gln-NH_2 und H-L-Pro-L-Phe-L-Gln-OMe gelangt man, indem man Boc-L-Pro-L-Phe-OH mit dem entsprechenden Glutaminderivat nach der 'Mixed-Anhydrid'-Methode umsetzt,die Boc-Gruppe abspaltet und mit NH_3 (conc.) neutralisiert).

Unter gleichen Bedingungen wird auch L-Phe-L-Pro-L-Glu(OMe)-OMe.TFA und L-Phe-L-Pro-L-Glu(OEt)OEt)TFA behandelt. Mit einer Ausnahme wurden die bisherigen Ergebnisse bestätigt; lediglich beim Dimethylester ließ sich zusätzlich die Sequenz L-Phe-L-Pro-L-Isogln-OMe nachweisen.

Versuche, die Tripeptide L-Pro-L-Phe-L-Isogln-OMe-TFA und L-Phe-L-Pro-L-Isogln-OMe.TFA zu den gewünschten Pyroglutamylpeptiden zu cyclisieren, führten ebenfalls nur zu den Diamiden. Analog lagen die Verhältnisse bei den Tripeptiden, die die Glutaminsäure-γ-ester mittelständig enthalten. Während die Äthylester nahezu quantitativ die entsprechende Glutaminverbindung bildeten, entstand letztere aus den Methylestern nur zu ca.5o %. +)

Nachfolgendes Schema veranschaulicht den Synthesegang zum Glutaminreferenzpeptid; analog wird die Synthese von L-Phe-L-Gln-L-Pro-NH_2 durchgeführt.

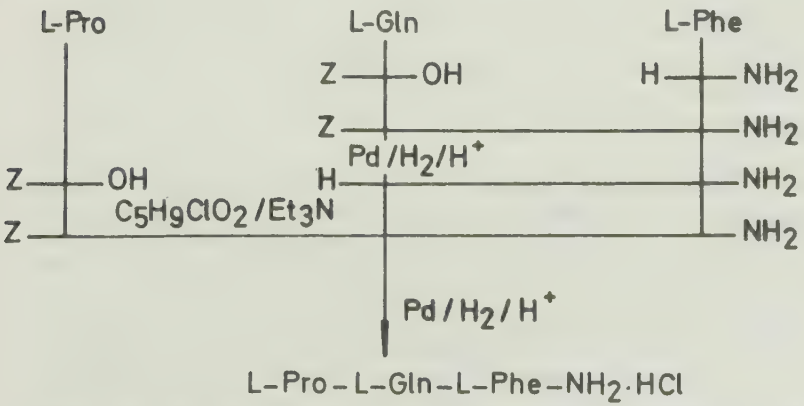
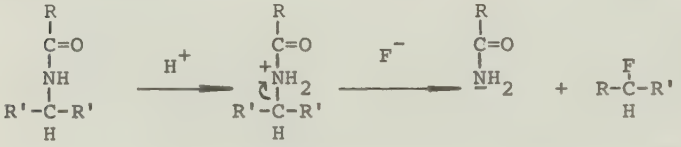


Abb. 17: Syntheseschema des Referenzpeptids L-Pro-L-Gln-L-Phe-NH_2.

+) Bei Verwendung von flüssigem Ammoniak änderten sich die Ergebnisse nicht.

Die Kombination saurer und alkalischer Bedingungen führte ebenfalls nicht näher ans Ziel. In keinem Fall ließ sich die gewünschte Pyroglutamylsequenz nachweisen. Aus Boc-L-Pro-L-Phe-L-Gln(Mbh)-OMe entstand bei Behandlung mit HF und anschließender Amidierung L-Pro-L-Phe-L-Gln-NH_2 und L-Pro-L-Phe-L-Gln-OMe. Dies spricht für einen nicht üblichen Verlauf der Abspaltungsreaktion des Dimethoxybenzhydrylrestes. Das Carboniumion bildet sich nicht wie gewöhnlich am Kohlenstoff der Seitenkettencarboxylgruppe des Glutaminrestes aus, sondern am Methinkohlenstoff der Schutzgruppe, der dadurch in die planare Struktur übergeht. Durch nachfolgende Valenzisomerisierung bleibt die Amidgruppierung erhalten und Dimethoxybenzhydrylfluorid wird in einer SN-Reaktion abgespalten.



Außerdem wurden im Dünnschichtchromatogramm 3 weitere lipophile, bisher nicht identifizierte Produkte nachgewiesen. Die Cyclisierung von Boc-L-Phe-L-Pro-L-Gln(Mbh)-OMe zeigte ein ähnliches Bild: Neben 2 unbekannten lipophilen Verbindungen wurden auch hier L-Phe-L-Pro-L-Gln-NH_2 und L-Phe-L-Pro-L-Gln-OMe eindeutig nachgewiesen. Die Synthese dieser Referenzpeptide wurde analog der bisher beschriebenen Darstellungen von L-Pro-L-Phe-L-Gln-NH_2 (Gln-OMe) durchgeführt.
Durch Verwendung von Trifluoressigsäure konnten keine anderen Ergebnisse erzielt werden.

Unter gleichen Bedingungen sind auch die Sequenzen Boc-L-Pro-L-Phe-L-Glu(OBzl)-OMe und Boc-L-Phe-L-Pro-L-Glu(OBzl)-OMe untersucht worden. Bei beiden Sequenzen entstand in hohem Prozentsatz L-Pro-L-Phe-L-Isogln bzw. L-Phe-L-Pro-L-Isogln.
Ein zweites Produkt, das bei beiden Sequenzen gebildet wurde, dürfte mit der Sequenz L-Pro-L-Phe-L-Glu(OH)-OMe bzw. L-Phe-L-Pro-L-Glu(OH)-OMe identisch sein. Ein Peptid, das im Rf-Wert dem Phe^2-TRH oder der Sequenz L-Pyr-L-Pro-L-Phe-NH_2 entsprochen hätte, wurde nicht gefunden.

Ob aus Boc-L-Pro-L-Phe-L-Gln(Mbh)-OMe und Boc-L-Pro-L-Phe-L-Glu(OBzl)-OMe und deren Stellungsisomeren zunächst der entsprechende Pyroglutamylpeptidester gebildet wird, konnte nicht überprüft werden. Wahrscheinlich ist dies jedoch nicht der Fall, da bei der anschließenden Amidierung zumindest teilweise das Pyroglutamylpeptidamid entstehen müßte, das in seinem Rf-Wert nur unwesentlich vom Phe^2-TRH oder der Sequenz L-Pyr-L-Pro-L-Phe-NH_2 abweichen dürfte und somit nachweisbar sein sollte.

Bei den Peptiden, die zur Cyclisierung nur mit Fluorwasserstoff oder Trifluoressigsäure behandelt wurden, ließen sich die gewünschten Pyroglutamylpeptide nachweisen. Ihre Isolierung mußte mit Mitteldruckchromatographie durchgeführt werden, da herkömmliche Säulenchromatographie die heterogenen Reaktionsgemische nicht mehr aufzutrennen vermochte. Die Abbildungen 18 - 21 zeigen die Originalelutionsdiagramme der nicht weiter vorbehandelten Cyclisierungsansätze. Zur Chromatographie wurden folgende Bedingungen gewählt: Die Trennungen wurden an DC-1A Harz der Firma Durrum, Chemical Comp. Palo Alto, USA durchgeführt. Der Druck lag zwischen 5o - 75 bar;der Durchlauf betrug 1,4 ml/min. Durch das Teilverhältnis waren ca. 8 % Verlust bedingt. Die Partialhydrolyse wurde innerhalb 8 min mit 5N NaOH mit der effektiv wirksamen Konzentration von 3,5 - 3,6 N durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit Ninhydrin, mit O - O,5 EE bei 57o nm. Als Puffer wurde Pyridinacetat der pH-Werte 3,2, 4,2, 5,2 und 4,8 verwendet, mit den entsprechenden Molaritäten o,2, o,5, 1,o und 4,o.

Zur Identifizierung wurden zunächst alle 'peaks' dünnschichtchromatographisch untersucht. Wie zu erwarten, hatten die weniger basischen Reaktionsprodukte z.B. Peptide mit freier Glutaminsäureseitenkettencarboxylgruppe kürzere Elutionszeiten, während die Pyroglutamylpeptide später eluiert wurden. Die Produkte, die in ihrem Rf-Wert etwa dem Phe^2-TRH bzw. der Sequenz L-Pyr-L-Pro-L-Phe-NH_2 entsprachen, wurden IR- und massenspektroskopisch vermessen.

Herrn Dr.H.Bauer, Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl I, danke ich für die freundliche Durchführung der Mitteldrucktrennungen.

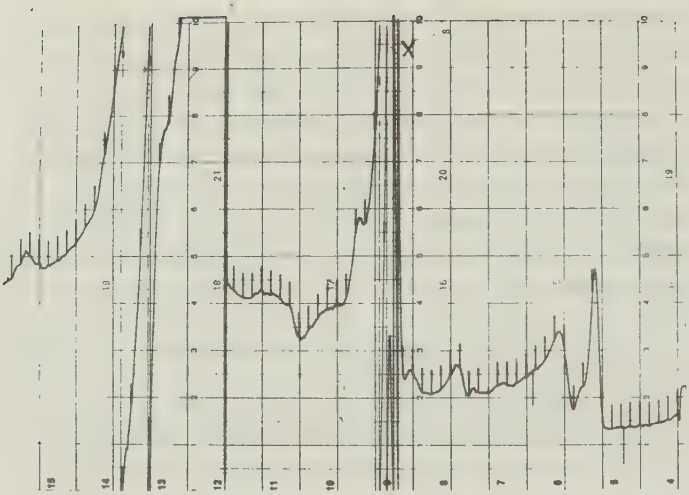


Abb.18: Elutionsdiagramm des Cyclisierungsansatzes Boc-L-Pro-L-Phe-L-Isogln-OBzl ⟶ L-Pro-L-Phe-L-Pyr-NH_2 über TFA. Der mit x markierte Peak entspricht dem Pyroglutamylpeptid. Aufgetragene Konzentration 1oo mg/ml. Auftragsmenge 2 ml.

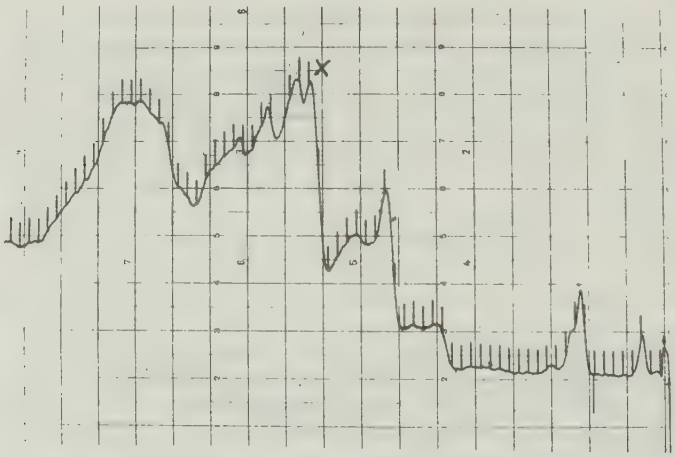


Abb.19: Elutionsdiagramm des Cyclisierungsansatzes Boc-L-Pro-L-Phe-L-Isogln-OBzl ⟶ L-Pro-L-Phe-L-Pyr-NH_2 über HF.
Der mit x markierte Peak entspricht dem Pyroglutamylpeptid.
Aufgetragene Konzentration 8o mg/ml. Auftragsmenge 2 ml.

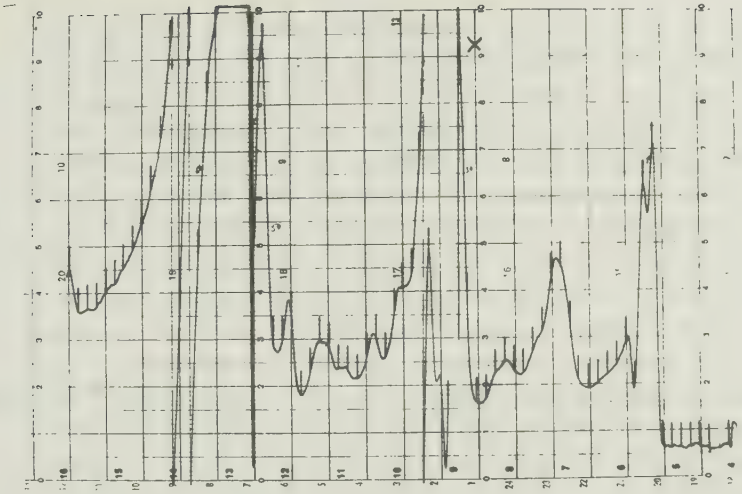


Abb.2o: Elutionsdiagramm des Cyclisierungsansatzes Boc-L-Phe-L-Glu(OBzl)-L-Pro-NH_2 ⟶ L-Phe-L-Pyr-L-Pro-NH_2 über TFA. Der mit x markierte Peak entspricht dem Pyroglutamylpeptid. Aufgetragene Konzentration 95 mg/ml. Auftragsmenge 2 ml.

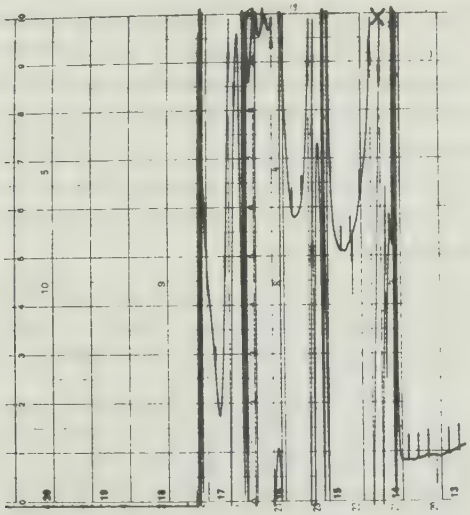


Abb.21: Elutionsdiagramm des Cyclisierungsansatzes Boc-L-Phe L-Glu(OBzl)-L-Pro-NH_2 ⟶ L-Phe-L-Pyr-L-Pro-NH_2 über HF. Der mit x markierte Peak entspricht dem Pyroglutamylpeptid. Aufgetragene Konzentration 1oo mg/ml. Auftragsmenge 2 ml.

Dabei wurde festgestellt, daß die Cyclisierung immer nur dann stattgefunden hatte, wenn Phenylalanin mit der Carboxylgruppe an Glutaminsäure-γ-benzylester oder Isoglutaminbenzylester geknüpft war. Die entsprechenden Sequenzen L-Pro-L-Pyr-L-Phe-NH_2 und L-Phe-L-Pro-L-Pyr-NH_2 konnten nicht nachgewiesen werden. Ebensowenig ließen sich die Peptide Boc-L-Pro-L-Gln(Mbh)-L-Phe-NH_2 und Boc-L-Phe-L-Gln(Mbh)-L-Pro-NH_2 über HF oder TFA cyclisieren. Abbildung 22 zeigt das IR-Spektrum (KBr) von L-Phe-L-Pyr-L-Pro-NH_2, das stellvertretend für die übrigen IR-Spektren diskutiert werden soll. Charakteristisch ist bereits das Fehlen der breiten NH-Bande bei 3300 cm^{-1} für Peptide mit N-terminaler Pyroglutaminsäure; vielmehr lassen sich die symmetrischen (3120 cm^{-1}) und asymmetrischen (3450 cm^{-1}) NH-Valenzschwingungen beobachten, die für das Vorliegen eines primären Säureamids sprechen. Ebenfalls noch deutlich abgesetzt liegen in diesem Bereich (3000 cm^{-1}) die CH-Valenzschwingungen des Prolin- und Pyroglutaminsäurerings. Am meisten Bedeutung kommt jedoch den beiden Banden bei 1745 cm^{-1} und 1690 cm^{-1} zu. Sie entsprechen Verbindungen vom Typ -CO-NR-CO-, denen in der Literatur [48] zwei Banden bei 1670-1710 cm^{-1} und 1720-1785 cm^{-1} zugeordnet werden. Diese Ergebnisse decken sich gut mit Angaben von E.Klieger und H.Gibian [48], die bei N-substituierter Pyroglutaminsäure neben der intensiven Lactambande bei 1690 cm^{-1} eine zweite Bande bei 1770-1785 cm^{-1} angeben. Faßt man die 'Pseudopeptidbindung' zwischen Phenylalanin und Pyroglutaminsäure als N-substituiertes Imid oder tertiäres Amid auf, so stimmen auch hier die Werte der Literatur [49] für die C=O Valenzschwingung gut mit den gefundenen überein.

Im Bereich von 1580-1620 cm^{-1} werden die CNH-Deformations- und C-N-Valenzschwingung von Amid-II-Bande eindeutig erkannt. Schwierig wird die Zuordnung im Bereich von 1490-1520 cm^{-1}; hier kann es sich sowohl um CH-Deformationsschwingungen des Aromaten als auch um eine NH-Spreizschwingung des Amids handeln. Die intensivere Bande um 1400 cm^{-1} dürfte auf CH-Deformationsschwingungen zurückzuführen sein. Die beiden Banden bei 745 cm^{-1} und 695 cm^{-1} belegen die Anwesenheit eines aromatischen, nicht weiter substituierten Kerns.

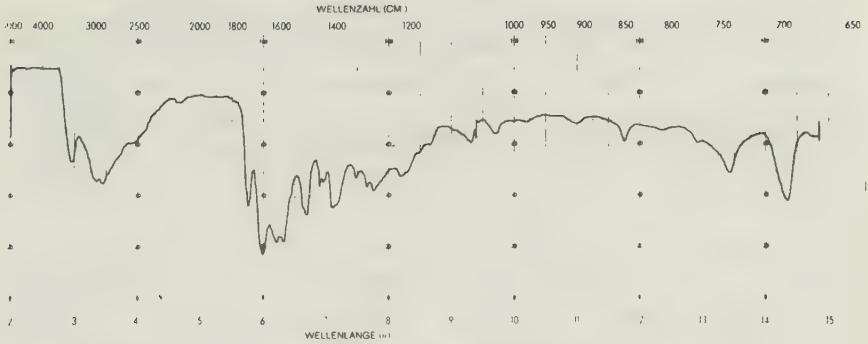


Abb. 22: IR-Spektrum (KBr) von L-Phe-L-Pyr-L-Pro-NH_2.

Die IR-Daten werden durch das Massenspektrum bestätigt. Für das Vorliegen der Pyroglutamylsequenz spricht zunächst das relativ intensive Molekülion mit der Masse 372. Durch Bruch der 'Pseudopeptidbindung' zwischen Phenylalanin und Pyroglutaminsäure entsteht das charakteristische Fragment Pyr-Pro-NH_2^+ und Bruchstücke des Phenylalanins mit den Massen 224, 148 und 147. Bricht die Peptidbindung zwischen Pyroglutaminsäure und Prolinamid, so führt dies zum Kation Phe-Pyr-CO^+ mit der Masse 259. Diese beiden Dipeptidkationen dürften ein zwingender Beweis für das Vorliegen des gewünschten Pyroglutamylpeptids sein. Außerdem findet man die charakteristischen Fragmente mit den Massen 11o, 112, 258 und 223. Diese Bruchstücke werden in einer Publikation in Kürze genauer interpretiert.

Zieht man das Resümée der durchgeführten Untersuchungen, so kann man sagen, daß sich Peptide mit mittel- oder carboxylendständiger Pyroglutaminsäure auf diese Weise darstellen lassen.
Wie jedoch mit Hilfe der Mitteldruckchromatographie gezeigt werden konnte, entstehen unter diesen Reaktionsbedingungen aus dünnschichtchromatographisch sauberen Ausgangsverbindungen eine Vielzahl zusätzlicher Produkte, sodaß die Ausbeuten extrem niedrig liegen. Zudem scheint das Entstehen dieser Peptide von der Sequenz der Peptidkette abzuhängen, da nie die Verbindungen nachgewiesen werden konnten, bei

denen Prolin mit dem Lactamstickstoff der Pyroglutaminsäure verknüpft ist; dies läßt sterische Einflüsse vermuten.

Ob Änderungen der Reaktionsbedingungen zu einer Optimierung der Ausbeute führen würden, bleibt dahingestellt, denn bei längerem Einwirken von HF oder TFA dürfte die Spaltung der Peptidkette als Nebenreaktion wesentlich mehr ins Gewicht fallen.

III. Experimenteller Teil

1. Geräte, Chemikalien, Schutzgruppen, Dünnschichtchromatographie

a) Geräte

Zur Messung der ^{13}C-Resonanz wurden ein HFX-9o-Multikern-NMR-Spektrometer (22,63 MHz für ^{13}C) und ein Gerät vom Typ WP 6o (15,o8 MHz für ^{13}C) der Firma Bruker verwendet.

Die Impulsinterferogramme werden in einem BNC-12 und BNC-28-Computer gespeichert und Fourier transformiert.
Der Pulswinkel liegt zwischen 2 - 3,5 µsek.; $DMSO_{d6}$ (Hexadeuterodimethylsulfoxid) wird zur ^{2}H-Stabilisation und als Lösungsmittel verwendet. Die Konzentration der Proben betrug 25o mg/ml. Die Proben wurden auf 3o° temperiert. Die chemischen Verschiebungen werden auf Tetramethylsilan als externen Standard bezogen.

Die IR-Spektren wurden mit den Geräten 2o21 und o21 der Firma Perkin-Elmer, Überlingen, gemessen. Die Schichtdicke betrug 1,5 mg/3oo mg; Phase:KBr; Prisma:NaCl.

Die Massenspektren wurden mit den Geräten MS9 der Firma AEI und MAT 711 der Firma Varian, Bremen gemessen. Einlaßsystem: direkt; Elektronen-Energie: 7o eV; Ionenquellen-Temperatur: 23o°C.

Die Schmelzpunkte wurden auf einem Schmelzpunktbestimmungsapparat Monoskop IV nach Dr.Tottoli der Firma Büchi, Schweiz, bestimmt und sind nicht korrigiert.

Die Drehwerte wurden mit einem Digitalpolarimeter (OLD 5) der Firma Zeiss, Oberkochen gemessen. Die α_D-Werte wurden durch Extrapolieren bestimmt.

Zur Chromatographie wurde ein Fraktionssammler vom Typ LKB 7ooo, eine Peristaltikpumpe und zur Detektion ein Uvicord-II-Gerät der Firma LKB, Stockholm benutzt.

b) Chemikalien

Die Lösungsmittel wurden nach Organikumsvorschriften absolutiert und über Molekularsieb aufbewahrt. N,N-Dimethylformamid (Art. 3o34), Tetrahydrofuran (Art. 8223o6) und Äthylenglycoldimethyläther (Art. 8oo856) wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

Folgende Reagenzien zur Aminosäurederivatisierung und Peptidsynthese wurden ebenfalls von der Firma Merck, Darmstadt gekauft. Dicyclohexylamin (Art. 8o2948), Dicyclohexylcarbodiimid (Art. 8o2954); N-Äthylmorpholin (Art. 8o1295), 2,4,5-Trichlorphenol (Art. 8o8359) und Chlorameisensäureisobutylester (Art. 8o2358).
1-Hydroxybenzotriazol-monohydrat (Art. 15726-o) wurde von Aldrich-Europe, N-Hydroxysuccinimid (Art. 56.48o) von der Fluka AG., Buchs, Schweiz, bezogen.

Mit Ausnahme der L-Pyroglutaminsäure (Aldrich-Europe, Art. P 752o-2) wurden nur Merck-L-Aminosäuren eingesetzt. L(-)-Phenylalanin (Art. 7256 Lab), L(-)-Prolin (Art. 7434 Lab), L(+)-Glutamin (Art. 289, für biochemische Zwecke), L-Glutaminsäure (Art. 291, für biochemische Zwecke).

c) Schutzgruppen

Tert.-Butyloxycarbonyl-Azid[41] wurde aus Carbazinsäure-tert-butylester (Merck; Art. 8o1656) und Natriumnitrit in Eisessig dargestellt.

Benzyloxycarbonylchlorid [4o] wurde aus Benzylalkohol und Phosgen hergestellt.
O-Nitrophenylsulfenylchlorid wurde nach Wohlfahrt und Zinke [42] synthetisiert.
p-Toluolsulfonylchlorid wurde von der Firma Merck, Darmstadt bezogen (Art. 8o8326).

d) Dünnschichtchromatographie

Es wurden DC-Fertigplatten, Kieselgel 6o F 254, der Firma Merck benutzt.
Als Laufmittelsysteme kamen A (n-Butanol/Eisessig/Wasser,

3:1:1) und D (Chloroform/Methanol/Benzol/Wasser, 6o:4o:4o:5) zur Anwendung.
Die Chromatogramme wurden mit Ninhydrin-Lösung [55,56] oder Chlor-Tolidin-Lösung [57] entwickelt.

2. Aminosäurederivate

Die physikalischen Daten der Boc(Z)-geschützten Ausgangsverbindungen der L-Glutaminsäure, des L-Glutamins, des L-Phenylalanins und des L-Prolins sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die Boc-Aminosäuren werden in Anlehnung an Schnabel [5o], die Benzyloxycarbonyl(Z)-geschützten Aminosäuren nach verbesserten Bergmann, Zervas [4o] Vorschriften dargestellt.

Die Synthesen der übrigen Verbindungen werden,soweit erforderlich, beschrieben.

Derivate der L-Glutaminsäure

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-glutaminsäure-γ-methylester

L-Glutaminsäure-γ-methylester(Hydrochlorid)
(L-Glu(OMe)-OH.HCl), $C_6H_{12}NO_4Cl$/197,62
Darstellung nach R.A.Boissonnas [58]

Ausbeute: 1oo,8 g (62,5 % d.Th.); Fp.: 156-159° (Lit: 161°);
$[\alpha]_D^{25}$ = +25,2° (c=1,o1/AcOH)
Elementaranalyse
ber: C = 36,47 % H = 6,12 % N = 7,o8 % Cl = 17,93 %
gef: C = 36,33 % H = 6,1o % N = 6,89 % Cl = 17,96 %

Ein Teil des Esterhydrochlorids wurde ins Zwitterion überführt. Fp.: 184° (Lit: 182) [59].

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-glutaminsäure-γ-methylester
(Boc-L-Glu(OMe)-OH), $C_{11}H_{19}NO_6$/261,27

31 mmol (5 g L-Glu(OMe)-OH und 62 mmol (8,7 ml) Triäthylamin werden in 25 ml absolutem Pyridin suspendiert, mit 4o mmol (5,7 g) $BocN_3$ versetzt, für zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt, bis zum Öl eingeengt, in Essigester aufgenommen und

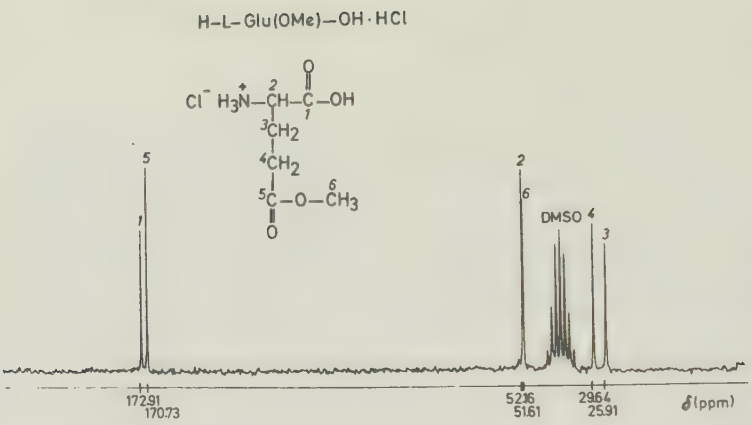
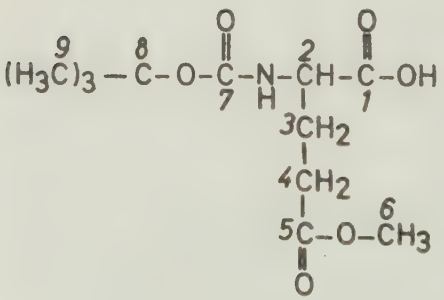


Abb. 23: ^{13}C-NMR-Spektrum von L-Glu(OMe)-OH.HCl.

mit Citronensäure (1o%ig)/H_2O gewaschen. Man trocknet die organische Phase über Na_2SO_4, engt erneut bis zum Öl ein und trocknet im Hochvakuum.

Ausbeute an Öl: 4,85 g (59,8 % d.Th.); $[\alpha]_D^{25}$ = +2,43° (c=2,8/MeOH)



C 1 = 173,14
C 2 = 53,77
C 3 = 27,42
C 4 = 3o,o1
C 5 = 174,37
C 6 = 51,11
C 7 = 155,21
C 8 = 77,79
C 9 = 28,13

Fig. 1: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Boc-L-Glu(OMe)-OH.

Tabelle 1 : Physikalische Daten der Boc(Z)-geschützten Aminosäureausgangsverbindungen

Aminosäurederivat	pH	Ausbeute %	Fp °C gef.	Lit :	$[\alpha]_D^{25}$ gef.	Lit:	C	C Lit :	Lösungs-mittel
Boc-L-Glutamin-säure	1o	78	11o-112	11o-112[5o]	-1o,6 -14,7	-15,2[5o] -16,1[51]	1 1,89	1 1	AcOH MeOH
Boc-L-Glutamin	1o,1	57	115-117	114-118[52]	- 2,7	- 3,o[52]	1,1	1,93	EtOH
Boc-L-Phenyl-alanin	1o,1	86	86- 87	84- 86[5o]	- 4,1	- 4,o[5o]	1,53	1	AcOH
Boc-L-Prolin	9	84	134-135	134-136[5o]	-62,5	-6o [53]	1	1	AcOH
Z-L-Glutamin-säure	9	79,5	118-119	12o-121[54]	- 6,5	- 7,9[54]	2,2	1o	AcOH
Z-L-Glutamin	9	77	138-139	138-139,5[54]	- 6,9	- 7,1[54]	2	2	EtOH
Z-L-Phenylalanin	9	78	85- 86	88- 89[54]	+ 5,2	+ 5,1[54]	1	5	AcOH
Z-L-Prolin	9	82	77	77	-6o,2	-6o,5[54]	2	2	AcOH

Die Abbildungen 24 -25 sowie Fig. 2 -5 zeigen die entsprechenden ^{13}C-NMR-Daten.

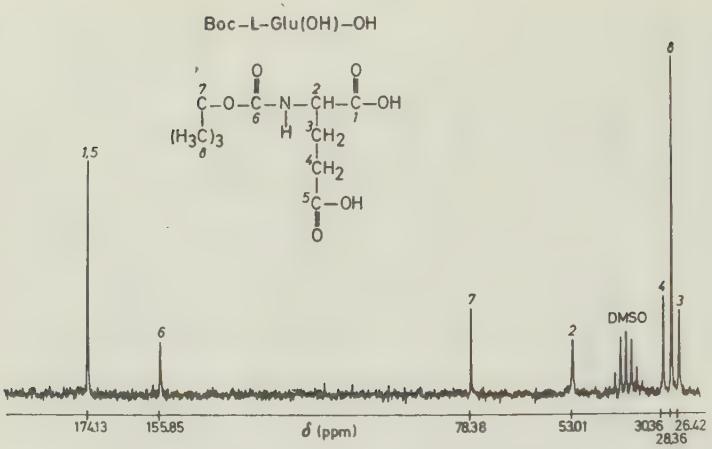


Abb. 24: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-L-Glu(OH)-OH.

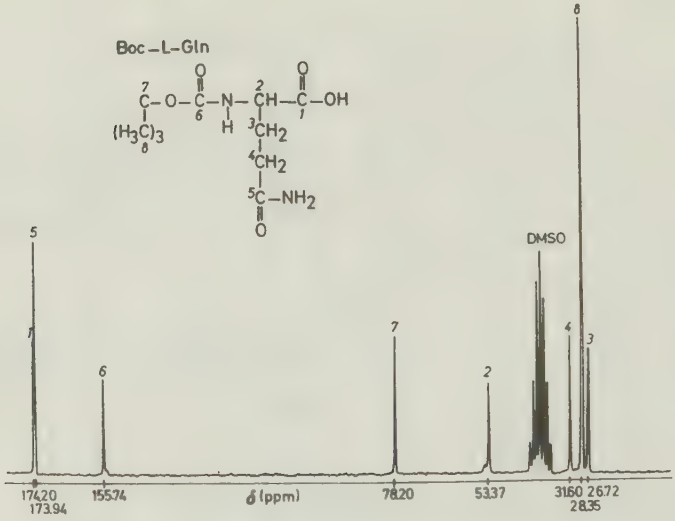
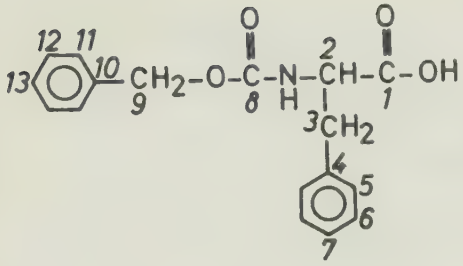
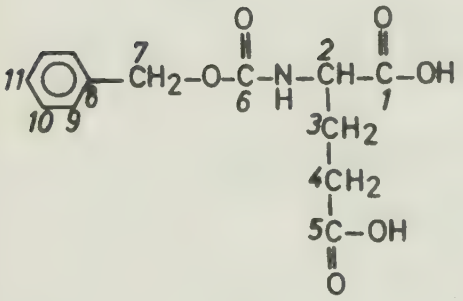


Abb. 25: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-L-Gln.



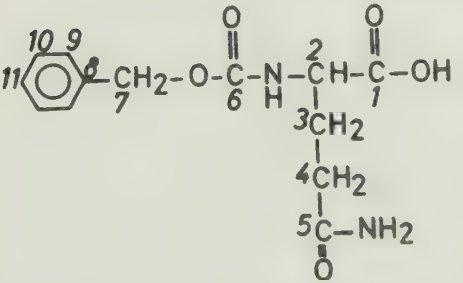
C 1 = 174,o6
C 2 = 56,1o
C 3 = 39,4o
C 4 = 137,21
C 8 = 156,o3
C 9 = 65,24
C1o = 138,36
C 5,6,7,11,12,13 = 129,25
= 128,34
= 128,1o
= 127,67
= 127,49
= 126,22

Fig. 2: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Z-L-Phe-OH.



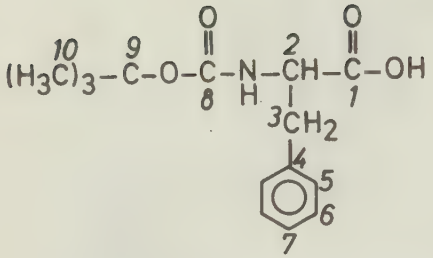
C 1 = 173,82
C 2 = 53,24
C 3 = 26,29
C 4 = 3o,17
C 5 = 173,94
C 6 = 156,39
C 7 = 65,63
C 8 = 137,o8
C 9,1o,11 = 128,46, 127,79

Fig. 3: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Z-L-Glu-(OH)-OH



C 1 = 174,oo
C 2 = 53,8o
C 3 = 26,85
C 4 = 31,58
C 5 = 174,oo
C 6 = 156,46
C 7 = 65,7o
C 8 = 137,28
C 9 = 128,66
C1o = 128,41
C11 = 127,99

Fig. 4: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Z-L-Gln.



C 1 = 173,92
C 2 = 55,35
C 3 = 36,74
C 4 = 138,21
C 5 = 129,36
C 6 = 128,56
C 7 = 126,56
C 8 = 155,69
C 9 = 78,22
C1o = 28,38

Fig. 5: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Boc-L-Phe-OH.

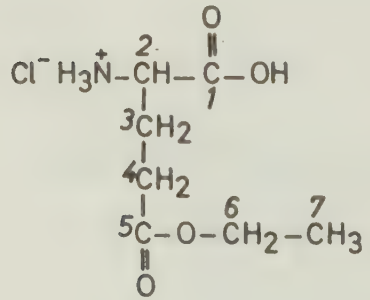
N-tert-Butyloxycarbonyl-L-glutaminsäure-γ-äthylester

L-Glutaminsäure-γ-äthylester(Hydrochlorid)
(L-Glu(OEt)-OH.HCl) $C_7H_{14}NO_4Cl$/211,64

Darstellung nach B.Hegedüs [6o]

Ansatz: 2o4 mmol (3o g) L-Glutaminsäure, Ausbeute: 27,2 g (63,3 % d.Th.); Fp: 133-134°, Lit: 134-135°; $[\alpha]_D^{25}$ = +2,65° (c=1/AcOH); Lit: $[\alpha]_D$ = +14° (c=1/H_2O).

Elementaranalyse
ber: C=39,73 % H = 6,67 % N = 6,62 % Cl = 16,75 %
gef: C=39,86 % H = 6,69 % N = 6,56 % Cl = 16,76 %



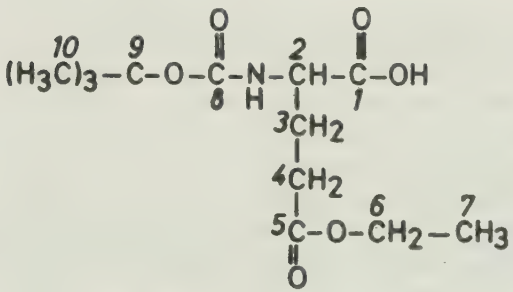
C 1 = 171,88
C 2 = 51,31
C 3 = 25,44
C 4 = 29,57
C 5 = 17o,42
C 6 = 6o,17
C 7 = 14,15

Fig.6 : ^{13}C-NMR-ppm-Werte von L-Glu(OEt)-OH.HCl.

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-glutaminsäure-γ-äthylester
(Boc-L-Glu(OEt)-OH), $C_{12}H_{21}NO_6$/275,3o

23,6 mmol (5 g) L-Glu(OEt)-OH .HCl werden in 25 ml absolutem Pyridin und 1oo ml absolutem DMF gelöst und mit 7o,8 mmol (9,96 ml) Triäthylamin versetzt, wobei das entstehende Zwitterion des Esters teilweise ausfällt. Nach Zugabe von 33,6 mmol (4,5 ml) $BocN_3$ rührt man für zwei Tage bei Raumtemperatur, destilliert dann das Lösungsmittel ab und nimmt in EE auf. Nach Waschen mit 1o%iger Citronensäure sowie H_2O trocknet man über Na_2SO_4, engt erneut bis zum Öl ein und entfernt dann letzte Reste von H_2O im Hochvakuum über $CaCl_2$.

Ausbeute an Öl: 4,15 g (63,7 % d.Th.); $[\alpha]_D^{25}$ = -7,33° (c = 1,16/MeOH).



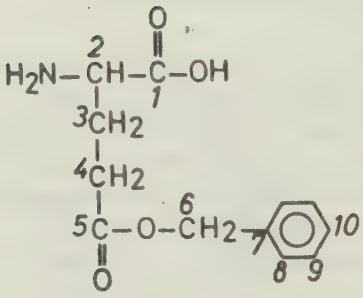
C 1 = 172,42
C 2 = 52,8o
C 3 = 26,34
C 4 = 3o,3o
C 5 = 173,98
C 6 = 6o,o1
C 7 = 14,18
C 8 = 155,77
C 9 = 78,28
C1o = 28,29

Fig. 7: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Boc-L-Glu(OEt)-OH.

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-glutaminsäure-γ-benzylester(Dicyclohexylammoniumsalz

L-Glutaminsäure-γ-benzylester
(L-Glu(OBzl)-OH) $C_{12}H_{15}NO_4$/237,25

Darstellung nach St.Guttmann und R.A.Boissonnas[61]:
Ansatz: o,5 mol L-Glutaminsäure; Ausbeute: 94,6 g (79,7 % d.Th.)
Fp: 185-186°, Lit: 189°; $[\alpha]_D^{25}$ = +18,87° (c=1,33/AcOH), Lit: $[\alpha]_D^{23}$ = +19,6° (c=6/AcOH).
Elementaranalyse
ber: C = 6c,75 % H = 6,37 % N = 5,9o %
gef: C = 61,92 % H = 6,53 % N = 5,68 %

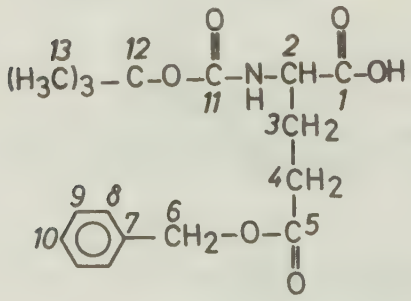


C 1 = 18o,89
C 2 = 59,1o
C 3 = 26,o1
C 4 = 3o,38
C 5 = 182,47
C 6 = 64,63
C 7 = 141,21
C 8 = 129,47
C 9 = 128,19
C1o = 128,55

Fig. 8: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von L-Glu(OBzl)-OH. (gemessen als Natriumsalz in Dioxan-D_2O)

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-glutaminsäure-γ-benzylester (Boc-L-Glu(OBzl)-OH), $C_{17}H_{23}NO_6$/337,25

Die Reaktion wird in Anlehnung an Stewart, Young, "Solid Phase Peptide Synthesis", W.H.Freeman and Company, San Francisco, p.3o, ausgeführt. o,12 mol (28,47 g) L-Glutaminsäure-γ-benzylester werden in 5oo ml absolutem DMF suspendiert, mit o,24 mol (32,4 ml) Triäthylamin und o,12 mol (18g) $BocN_3$ versetzt und für vier Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Ölvakuum nimmt man in EE auf, wäscht mit 1o%iger Citronensäure sowie H_2O, filtriert durch Na_2SO_4, engt bis zum Öl ein und trocknet dieses im Hochvakuum über $CaCl_2$. Ausbeute an Öl: 38,8 g (95,9 % d.Th.) $[\alpha]_D^{25} = -1,36^\circ$ (c=2,42/MeOH).



C 1 = 172,61
C 2 = 53,37
C 3 = 26,96
C 4 = 3o,42
C 5 = 174,37
C 6 = 65,7o
C 7 = 136,55
C 8 = 129,14
C 9 = 128,71
C1o = 128,11
C 11 = 155,79
C 12 = 78,26
C 13 = 28,36

Fig. 9: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Boc-L-Glu(OBzl)-OH.

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-glutaminsäure-γ-benzylester (Dicyclohexylammoniumsalz)

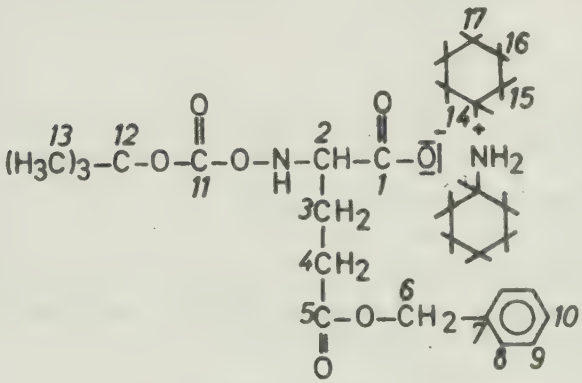
(Boc-L-Glu(OBzl)-OH.DCHA), $C_{29}H_{46}N_2O_6$/518,69

1o3,8 mmol (35 g) Boc-L-Glu(OBzl)-OH löst man in 2oo ml absolutem Äther und tropft 115 mmol (22,9 ml) Dicyclohexylamin, gelöst in wenig Äther, zu. Bereits nach einigen Minuten beginnt das Produkt zu kristallisieren. Nach Stehenlassen über Nacht bei 4° saugt man ab, schlemmt zur vollständigen Reinigung noch zweimal in der Fritte mit PÄ auf und wäscht gründlich mit Äther nach. Ausbeute: 33,7 g (62,6 % d.Th.); Fp: 14o-142°, Lit: 139-14o [62]; $[\alpha]_D^{25}$ = +1o,4° (c=1/MeOH), Lit: $[\alpha]_D$ = +14,o (c=1,1/MeOH).

Elementaranalyse

ber: C = 68,8 % H = 9,15 % N = 6,69 %

gef: C = 67,6 % H = 8,99 % N = 5,37 %



C 1 = 174,6o
C 2 = 5o,39
C 3 = 29,69
C 4 = 31,51
C 5 = 178,13
C 6 = 67,o2
C 7 = 137,69
C 8 = 129,5o
C 9 = 129,o1
C1o = 128,77
C11 = 157,36
C12 = 79,96
C13 = 28,77
C14 = 54,33
C15 = 3o,41
C16 = 25,44
C17 = 26,11

Fig.1o: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Boc-L-Glu(OBzl)-OH.DCHA, gemessen in CD_3OD.

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-glutaminsäureanhydrid

(Boc-L-Glu-$\overline{O}$), $C_{1o}H_{15}NO_5$/229,23

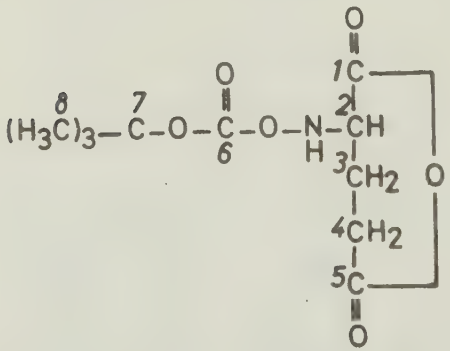
Zu o,5 mol (123,6 g) Boc-L-Glu, gelöst in 4oo ml absolutem THF, tropft man unter Eiskühlung o,55 mol (113,4 g) DCC in ca. 15o ml THF (abs.). Bereits nach kurzer Zeit fällt Dicyclohexylharnstoff aus. Zur vollständigen Kristallisation des Harn-

stoffs beläßt man über Nacht im Tiefkühlschrank, saugt dann ab, engt bis zum Festprodukt ein und kristallisiert aus warmen Aceton um. Ausbeute: 86,9 g (75,8 % d.Th.); Fp: 116-118°, Lit: 115-116°[51]; $[\alpha]_D^{25}$ = -43,8° (c=o,91/AcOH), Lit: $[\alpha]_D^{25}$ = -47,7° (c=1/AcOH).

Elementaranalyse

ber: C = 52,4o % H = 6,6o % N = 6,11 %

gef: C = 52,17 % H = 6,75 % N = 5,99 %.



C 1 = 174,31
C 2 = 53,19
C 3 = 26,6o
C 4 = 3o,54
C 5 = 174,31
C 6 = 156,o4
C 7 = 78,63
C 8 = 28,54

Fig.11: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Boc-L-Glu-O.

L-Glutaminsäuredimethylester(Hydrochlorid)
(L-Glu(OMe)-OMe.HCl), $C_7H_{14}NO_4Cl$/211,64

Die Verbindung wird nach E.Fischer und R.Boehner[63] erhalten. Die Ausbeute beträgt bei o.2 molarem Ansatz nach Umkristallisation aus MeOH/Äther 28,3 g (66,8 % d.Th.); Fp: 93-96°; $[\alpha]_D^{25}$ = +22,o° (c=1,o1/AcOH).

Elementaranalyse

ber: C = 39,73 % H = 6,67 % N = 6,62 % Cl = 16,75 %

gef: C = 38,89 % H = 6,6o % N = 6,39 % Cl = 16,47 %.

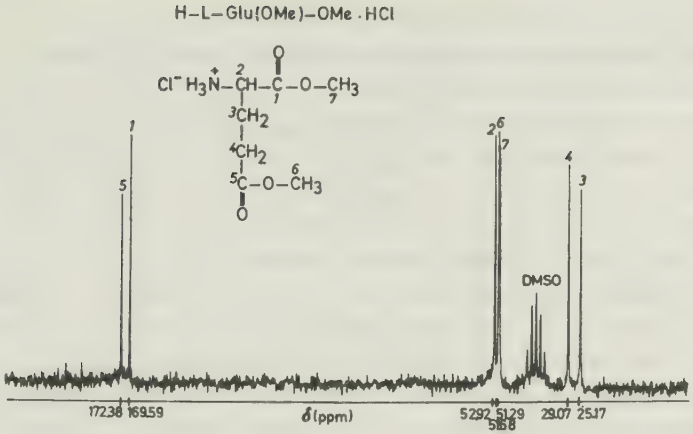


Abb. 26: ^{13}C-NMR-Spektrum von L-Glu(OMe)-OMe.HCl.

L-Glutaminsäurediäthylester(Hydrochlorid)
(L-Glu(OEt)-OEt.HCl) $C_9H_{18}NO_4Cl/239,7o$

Darstellung erfolgt ebenfalls nach E.Fischer und R.Boehner[63]; sowie nach M.Goodman et al.[64]. Bei o,68 molarem Ansatz liegt die Ausbeute nach Umkristallisation aus MeOH/Äther bei 96,7 g (6o % d.Th.); Fp: 112°, Lit: 1o9-11o°; $[\alpha]_D^{25}$= +21,5° (c=2/EtOH); Lit: $[\alpha]_D$= 22,5° (c=2/EtOH);

Elementaranalyse

ber: C = 45,1o % H = 7,57 % N = 5,84 % Cl = 14,79 %

gef: C = 45,12 % H = 7,77 % N = 5,87 % Cl = 15,16 %

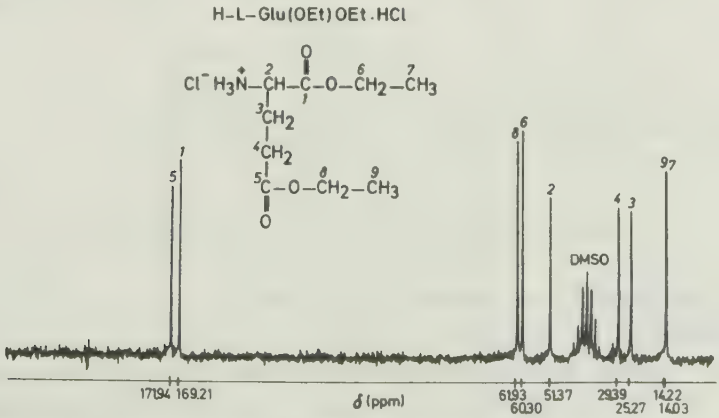


Abb.27: ^{13}C-NMR-Spektrum von L-Glu(OEt)-OEt.HCl.

L-Glutaminsäure-γ-benzylester-α-methylester

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-glutaminsäure-γ-benzylester-α-methylester (Boc-L-Glu(OBzl)-OMe), $C_{18}H_{25}NO_6$/351,4o.

Aus 33 mmol Boc-L-Glu(OBzl)-OH.DCHA setzt man mit 65 ml 2 n Citronensäure den geschützten Ester aus seinem Salz frei. Die EE-Phase wird abgetrennt, nochmals sauer und neutral gewaschen und zum Öl eingeengt. Die Ausbeute ist quantitativ: 11,1 g; man nimmt in Methanol auf und versetzt dann so lange mit ätherischer Diazomethanlösung, bis eine ausgeprägte Gelbfärbung bestehen bleibt. Nach Stehenlassen über Nacht zerstört man überschüssiges Diazomethan mit einigen Tropfen Eisessig, engt bis zum Öl ein und kristallisiert aus Äther/Petroläther. Ausbeute: 7,8 g (67,2 % d.Th.); Fp: 42°; $[\alpha]_D^{25}$ = -18,14° (c=o,97/MeOH).

Elementaranalyse

ber: C = 61,53 % H = 7,17 % N = 3,99 %

gef: C = 6o,64 % H = 7,27 % N = 3,66 %.

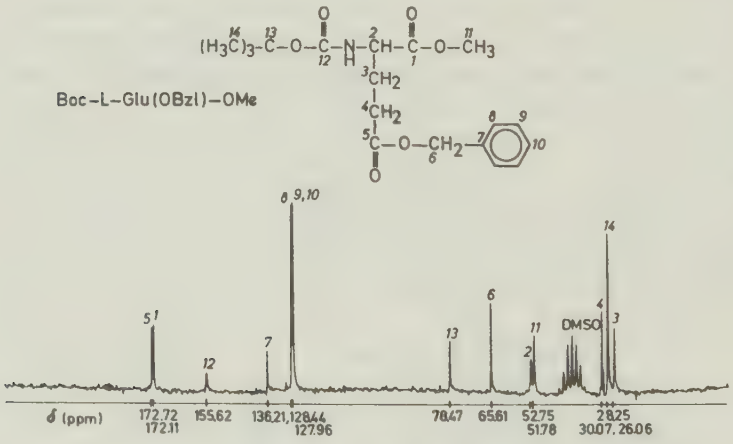


Abb. 28: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-L-Glu(OBzl)-OMe.

L-Glutaminsäure-γ-benzylester-α-methylester (L-Glu(OBzl)-OMe), $C_{13}H_{17}NO_4$/251,28

9,4 mmol (3,3 g) Boc-L-Glu(OBzl)-OMe werden in 2o ml absolutem CH_2Cl_2 gelöst und für 1h mit 25o mmol (ca. 2o ml) TFA bei Raum-

temperatur gerührt. Nach Abdestillieren der TFA nimmt man in Äthanol auf, neutralisiert mit NH_3-Lösung (conc.), engt abermals bis zum Öl ein, löst in EE und wäscht mit H_2O. Darauf wird durch Na_2SO_4 filtriert, der EE abgezogen und das verbliebene Öl im Hochvakuum über KOH getrocknet. Ausbeute: 2,3 g (97,5 % d.Th.); $Rf_{(A)}$ = o,66, $Rf_{(D)}$ = o,7o.

Benzyloxycarbonyl-L-Glutaminsäure-γ-methylester-α-phenylester

Benzyloxycarbonyl-L-Glutaminsäureanhydrid

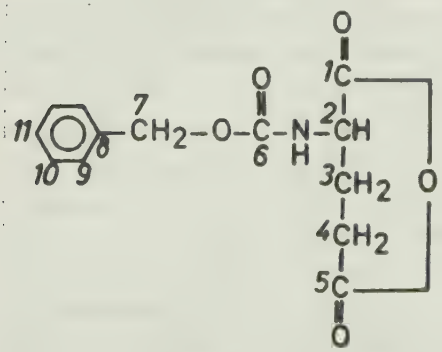
(Z-L-Glu-O), $C_{13}H_{13}NO_5$/263,2.

Die Darstellung erfolgt nach H.Gibian und E.Klieger [65] oder W.J.Le Quesne und G.T.Young [66]. Ausbeute bei 1,4 molarem Ansatz nach [65] 268 g (72,8 % d.Th.), bei 1,2 molarem Ansatz nach [66] 257 g (81,4 % d.Th.). Beide Produkte sind in ihren physikalischen Eigenschaften identisch. Fp: 88-92°, Lit: 91-92° [65], $[\alpha]_D^{25}$ = -28,o3° (C = 1,32/AcOH), Lit: [65] $[\alpha]_D^{25}$ = -43,o° (c=1o/AcOH);

Elementaranalyse

ber: C = 59,31 % H = 4,98 % N = 5,32 %

gef: C = 59,36 % H = 5,31 % N = 5,86 %.



C 1 = 173,88
C 2 = 5o,27
C 3 = 22,47
C 4 = 29,63
C 5 = 174,o7
C 6 = 156,22
C 7 = 66,o6
C 8 = 136,97
C 9,1o,11 = 128,59;127,99

Fig. 12: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Z-L-Glu-O.

Benzyloxycarbonyl-L-Glutaminsäure-α-phenylester-Dicyclohexylamin-Salz (Z-L-Glu(DCHA)-α-phenylester) $C_{31}H_{42}N_2O_6$/578,7

Die Verbindung wird nach E.Klieger und H.Gibian [67] hergestellt. Ansatz: o,6 mol Z-L-Glu-O. Ausbeute: 175,5 g (54,3 % d.Th.); Fp: 151-154°, Lit: 152-153° (159-16o); $[\alpha]_D^{25}$ = -8,7° (c=1,o5/MeOH), Lit: $[\alpha]_D^{25}$ = -11,8° (c=o,7/$CHCl_3$).

Elementaranalyse

ber: C = 69,13 % H = 7,85 % N = 5,2o %

gef: C = 69,25 % H = 7,72 % N = 4,33 %.

Benzyloxycarbonyl-L-glutaminsäure-γ-methylester-α-phenylester (Z-L-Glu(OMe)-OC_6H_5) $C_{2o}H_{21}NO_6$/371,4

Aus 1oo mmol (54 g) Z-L-Glu(OH)-OC_6H_5.DCHA in 5oo ml EE wird der Ester mit 4o ml 5n HCl/EE durch 1 1/2-stündiges Rühren freigesetzt. Nach Waschen, Trocknen und Einengen der EE-Phase, wird der Ester ohne weitere Charakterisierung in Aceton aufgenommen und mit ätherischer Diazomethanlösung umgesetzt. Nach Stehenlassen über Nacht zerstört man überschüssiges Diazomethan mit Eisessig, zieht das Lösungsmittel ab, überschichtet mit Diisopropyläther und erwärmt auf 4o°. Der gemischte Diester fällt bereits in der Wärme aus. Ausbeute: 28,5 g (76,7 % d.Th.); Fp: 92-94°, Lit. [67]: 95-96°; $[\alpha]_D^{25}$ = -35,17° (c= 1,18/MeOH), Lit: $[\alpha]_D^{25}$= -35,4° (c=1,18/MeOH).

Elementaranalyse

ber: C = 64,69 % H 5,7o % N = 3,77 %

gef: C = 64,64 % H 5,97 % N = 3,98 %.

4-Toluolsulfonyl-L-glutaminsäure

(Tos-L-Glu), $C_{12}H_{15}NO_6S$/3o1,32

Tos-L-Glu wird nach Harington und Moggridge [68] synthetisiert. Die Ausbeute beträgt bei o,5 molarem Ansatz 114,49 g (76 % d.Th.); Fp: 13o-131° Lit: 131°; $[\alpha]_D^{25}$ = -2o,o6° (c=o,95/DMF), Lit: $[\alpha]_D^{21}$= +22,o°/EE)

Elementaranalyse

ber: C = 47,84 % H = 5,o2 % H = 4,65 % S = 1o,64 %

gef: C = 45,1o % H = 4,86 % H = 4,oo % S = 9,69 %.

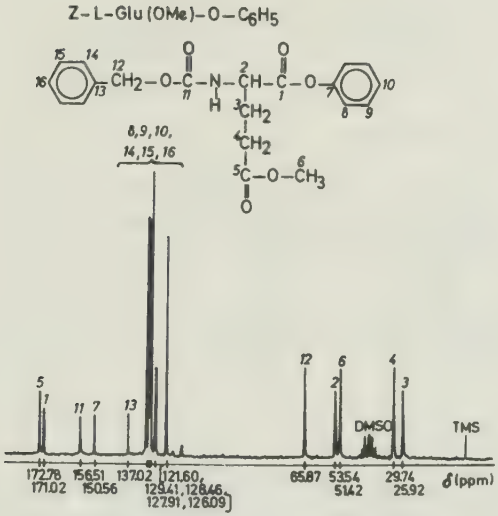


Abb. 29: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-L-Glu(OMe)-OC_6H_5.

Derivate des L-Glutamins

L-Glutaminmethylester(Hydrochlorid)

Benzyloxycarbonyl-L-Glutaminmethylester

(Z-L-Gln-OMe), $C_{14}H_{18}N_2O_5$/244,31

Variante A

Die Verbindung wird nach U.Weber [69] über DCC/HOBt-Kupplung synthetisiert. Ausbeute bei 8o mmolarem Ansatz: 2o,3 g (86,2 % d.Th.); Fp: 14o°, Lit: 14o-141° 7o); $[\alpha]_D^{25}$ = -19,89° (c= o,99/MeOH), Lit: $[\alpha]_D^{23}$= -19,4° (c=1/MeOH);

Elementaranalyse

ber: C = 57,14 % H = 6,16 % N = 9,52 %

gef: C = 57,5o % H = 6,38 % N = 9,41 %.

Variante B

Darstellung nach Sondheimer7o) über Z-L-Glutamin und Diazomethan in absolutem Alkohol. (Obwohl die in der Literatur angegebenen Bedingungen exakt eingehalten worden sind, ließ sich eine Methylierung des Amids nicht vermeiden). Ausbeute

bei 76 mmolarem Ansatz: 11,6 g (52 % d.Th.); Fp: 139-141°, Lit: 14o-141°. ; $[\alpha]_D^{25}$ = -19,23° (c=1,o3/MeOH), Lit: siehe oben.

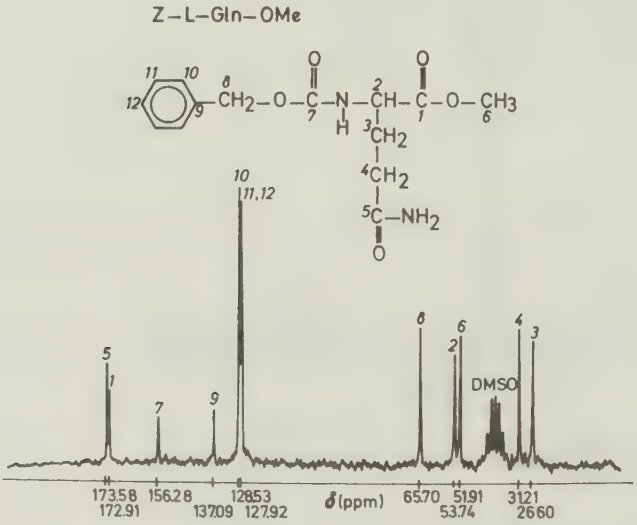


Abb. 3o: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-L-Gln-OMe.

L-Glutaminmethylester(Hydrochlorid)
(L-Gln-OMe.HCl) $C_6H_{13}N_2O_3Cl$/196,63

1o2 mmol (3o g) Z-L-Gln-OMe, gelöst in MeOH/H_2O werden an 3 g Platin-Aktivkohle-Katalysator im Durchflußverfahren bei pH 4 hydriert. Nach üblicher Aufarbeitung beträgt die Ausbeute 2o,3 g (98,5 % d.Th.); Fp: 144-145°, Lit: 141° [71]; $[\alpha]_D^{25}$ = +31,1° (c=1/MeOH)

Elementaranalyse

ber: C = 36,65 % H = 6,66 % N = 14,25 % Cl = 18,o3 %

gef: C = 36,33 % H = 6,86 % N = 14,59 % Cl = 18,74.

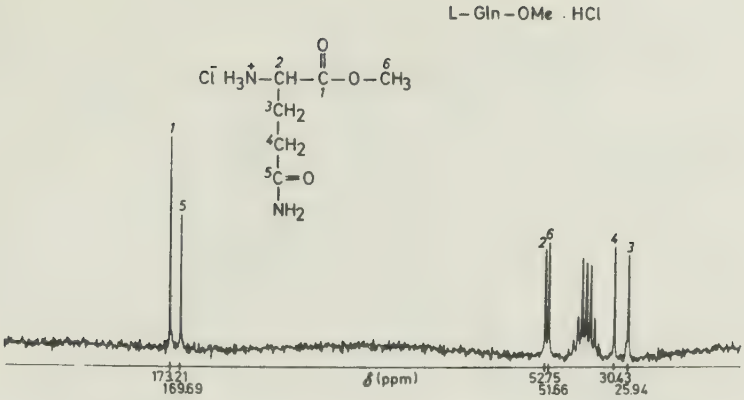


Abb. 31: ^{13}C-NMR-Spektrum von L-Gln-OMe.HCl.

4,4'-Dimethoxybenzhydryl-L-glutaminmethylester-hydrochlorid
Benzyloxycarbonyl-(4,4'-dimethoxybenzhydryl-)-L-glutamin (Z-L-Gln(Mbh)-OH), $C_{28}H_{30}N_2O_7$/506,6

Die Verbindung wird nach König und Geiger [72] erhalten. Ausbeute bei 0,5 molaremAAnsatz: 160,7 g (63,4 % d.Th.), Fp: 115-120°, Lit: 117-120°; $[\alpha]_D^{25}$ = -6,0° (c=2,16/DMF), Lit: $[\alpha]_D^{22}$ = -6,75° (c=2/DMF).

Elementaranalyse

ber: C = 66,39 % H = 5,97 % N = 5,40 %

gef: C = 67,02 % H = 6,08 % N = 4,57 %.

Benzyloxycarbonyl-(4,4'-dimethoxybenzhydryl)-L-glutaminmethylester (Z-L-Gln(Mbh)-OMe), $C_{29}H_{32}N_2O_7$/520,6

Ausführung nach Lit. [72]. Bei 30 mmolarem Ansatz liegt die Ausbeute bei 12,8 g (81 % d.Th.); Fp: 142-147°, Lit: 146-150°; $[\alpha]_D^{25}$ = -10,89 (c=0,9/DMF), Lit: $[\alpha]_D^{22}$ = -10,8° (c=2/DMF).

Elementaranalyse

ber: C = 66,84 % H = 6,14 % N = 5,37 %

gef: C = 67,30 % H = 6,43 % N = 6,30 %.

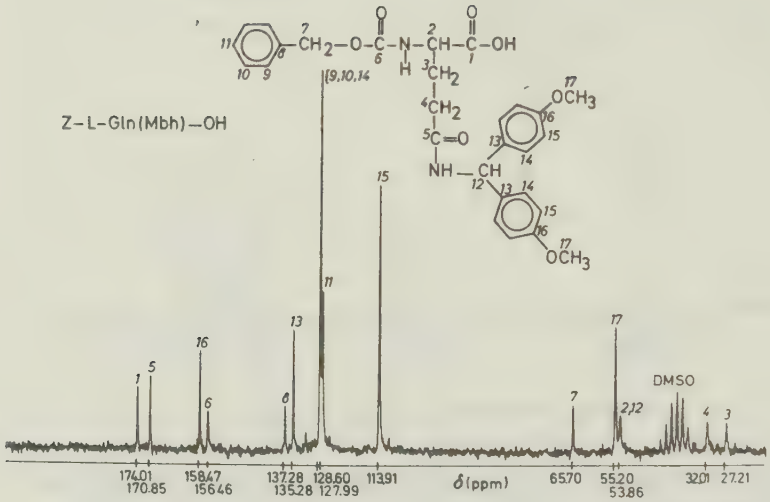


Abb. 32: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-L-Gln(Mbh)-OH.

4,4'-Dimethoxybenzhydryl-L-glutaminmethylester(Hydrochlorid) (L-Gln(Mbh)-OMe.HCl), $C_{21}H_{27}N_2O_5Cl$/422,9.

Darstellung nach Lit [72]. Ausbeute bei 2o mmolarem Ansatz: 6,7 g (79,2 % d.Th.); Fp: 18o-184°, Lit: 182-183°; $[\alpha]_D^{25}$ = +23,56° (c=1,o4/MeOH), Lit: $[\alpha]_D^{22}$ = +21,4° (c=2/MeOH).

Elementaranalyse

ber: C = 59,64 % H = 6,43 % N = 6,62 % Cl = 8,38 %

gef: C = 59,48 % H = 6,54 % N = 6,53 % Cl = 8,56 %.

o-Nitrophenylsulfenyl-L-glutamin (NPS-L-Gln), $C_{11}H_{13}N_3O_5S$/299,3o

Darstellung nach L.Zervas et al. [73] Ansatz: o,25 mol; Ausbeute: 57,1 g (76,3 % d.Th.); Fp: 168-171°, Lit: 165°; $[\alpha]_D^{25}$ = -7o,5° (c=o,99/DMF), Lit: $[\alpha]_D^{22}$ = -74,3° (c=2/DMF).

Elementaranalyse

ber: C = 44,14 % H = 4,38 % N = 14,o4 % S = 1o,71 %

gef: C = 43,37 % H = 4,19 % N = 13,35 % S = 1o,48 %.

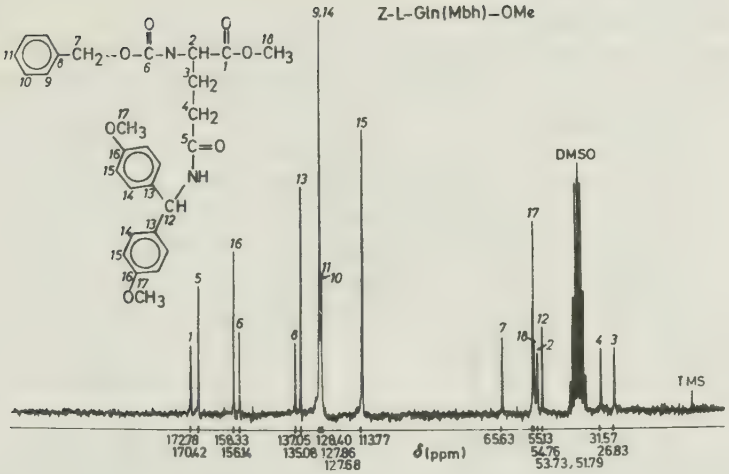
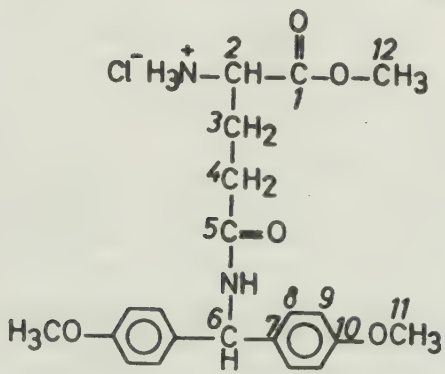


Abb. 33: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-L-Gln(Mbh)-OMe.



C 1 = 169,69
C 2 = 52,64
C 3 = 26,17
C 4 = 3o,54
C 5 = 169,99
C 6 = 51,6o
C 7 = 135,o2
C 8 = 128,34
C 9 = 113,71
C1o = 158,15
C11 = 55,o6
C12 = 54,82

Fig. 13: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von L-Gln(Mbh)-OMe.HCl.

L-Glutaminamid(Hydrochlorid)(L-Glutaminsäurediamid)
(L-Gln-NH_2), $C_5H_{12}N_3O_2Cl$/181,62

Variante A

33,4 mmol (1o g) NPS-L-Gln werden nach Ch.Meyers et al.[74] ohne Isolation der Zwischenstufen zum Diamid überführt. Ausbeute: 1,76 g (29 % d.Th., bezogen auf NPS-L-Gln); Fp: 197-2o2°, Lit: 193-196°; $[\alpha]_D^{25}$ = +19,6° (c=o,97/H_2O), Lit: $[\alpha]_D^{23}$ =

= +2o,1° (c=1/H_2O.

Elementaranalyse

ber: C = 33,o7 % H = 6,66 % N = 23,14 %

gef: C = 32,86 % H = 6,89 % N = 23,o5 %.

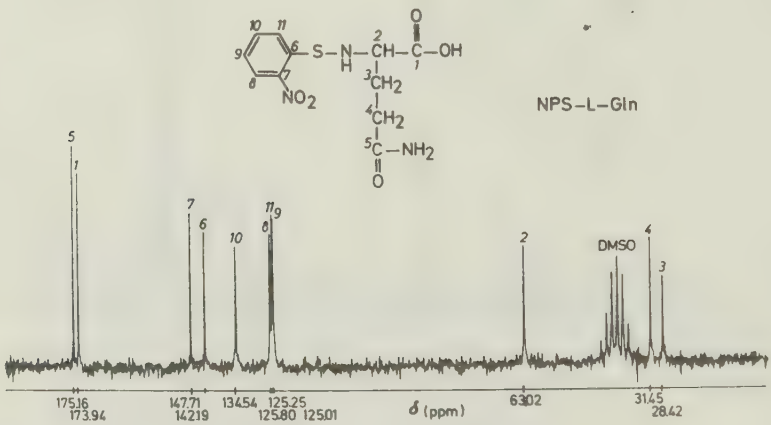


Abb. 34: ^{13}C-NMR-Spektrum von NPS-L-Gln.

Variante B

1o mmol (4,8 g) N-tert-Butyloxycarbonyl-L-glutaminpentachlorphenylester (dargestellt nach S.Visser et al. 75) werden in absolutem DMF gelöst und auf -1o° gekühlt. Man leitet darauf bis zur Sättigung NH_3-Gas in die Lösung ein und läßt die Reaktionsmischung 24 h bei Raumtemperatur stehen. Nach Abziehen des Lösungsmittels wird die Boc-Gruppe mit 1,2 n HCl in AcOH abgespalten und das Endprodukt aus MeOH/Äther umkristallisiert. Ausbeute: 423 mg (23,2 % d.Th.); Fp: 189-194°; $[\alpha]_D^{25}$ = +16,1° (c=1,o4/H_2O).

Variante C

Benzyloxycarbonyl-L-glutaminamid

(Z-L-Gln-NH_2), $C_{13}H_{17}N_3O_4$/279,29

14o mmol (39,2 g) Z-L-Gln werden in 45o ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst und auf 0° gekühlt. Man tropft dann 21,o8 ml

(äquimolar) Triäthylamin zu, wobei der Reaktionsansatz zähviskos wird und ein Weiterrühren nur nach Entfernen der Kühlung und Zugabe von DMF möglich ist. Mit Zutropfen des Chlorameisensäureisobutylesters (19,7 ml) verfärbt sich die Reaktionslösung innerhalb Sekunden intensiv dunkelrot, und nach Eintropfen der Ammoniaklösung (conc.) fällt ein gallertartiges Produkt aus, sodaß ein Weiterrühren unmöglich wird. Die Reaktionsmischung wird unter gelegentlichem heftigem Schütteln für 24 h stehengelassen und dann aufgearbeitet. Umkristallisation des Festprodukts aus Methanol. Ausbeute: 15,6 g (39,9 % d.Th.); Fp: 186-19o°, Lit: 185-7°)[74] $[\alpha]_D^{25}$ = +7,18° (c=o,97/DMF), Lit: $[\alpha]_D^{22}$ = -1o,3° (c=2/DMF).

Elementaranalyse

ber: C = 55,91 % H = 6,13 % N = 15,o5 %

gef: C = 53,33 % H = 6,o6 % N = 13,59 %.

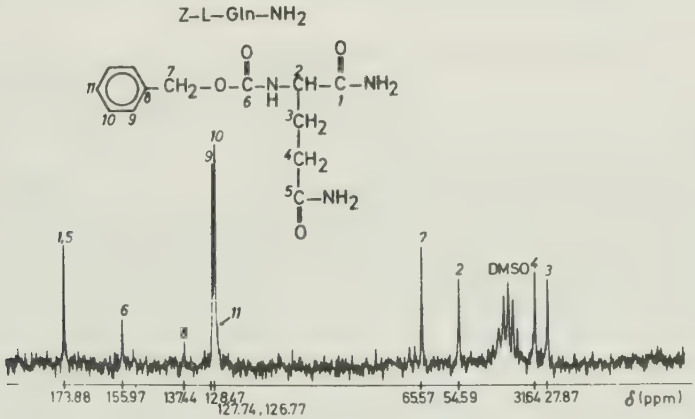


Abb. 35: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-L-Gln-NH_2.

L-Glutaminamid(Hydrochlorid)

45 mmol (12,57 g Z-L-Gln-NH_2 werden in 25o ml MeOH/H_2O (ca. 4:1) suspendiert und an 1,3 g Palladium-Aktivkohle-Katalysator bei pH = 2 im Durchflußverfahren hydriert. Nach üblicher Aufarbeitung kristallisiert man aus MeOH/Äther. Aus-

beute: 5,3 g (64,8 % d.Th.); Fp: 21o-212°; $[\alpha]_D^{25}$ = +18,2° (c=1,o7/H_2O).

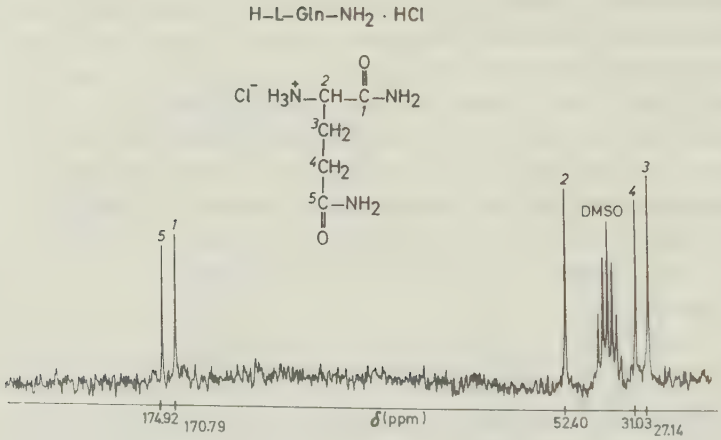


Abb. 36: ^{13}C-NMR-Spektrum von L-Gln-NH_2.HCl.

Variante D

4-Toluolsulfonyl-L-glutaminamid

(Tos-L-Gln-NH_2) $C_{12}H_{17}N_3O_4S$/299,35

166 mmol (5o,1 g) 4-Toluolsulfonyl-L-pyroglutamylchlorid [76] werden nach Swan und du Vigneaud [76] zum entsprechenden Diamid umgesetzt. Ausbeute: 49,7 g (quantitativ); Fp: ab 215° unter Zersetzung, Lit: ab 21o° unter Zersetzung; $[\alpha]_D^{25}$ = -5,67° (c=o,97/DMF) und +15,1° (c=1,o2/AcOH), Lit: $[\alpha]_D^{21}$ = +8,3° (c=1,7/AcOH).

Elementaranalyse

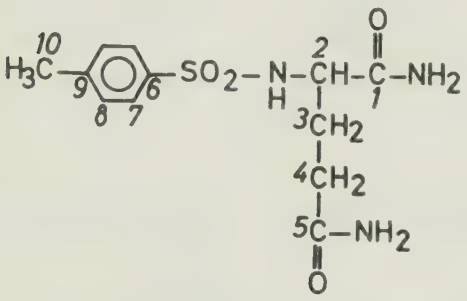
ber: C = 48,15 % H = 5,72 % N = 14,o4 % S = 1o,71 %

gef: C = 47,4o % H = 5,6o % N = 13,56 % S = 1o,41 %.

L-Glutaminamid (Hydrochlorid)

33,4 mmol (1o g) Tos-L-Gln-NH_2 werden nach Literatur [76] deblockiert, ins Hydrochlorid überführt und aus MeOH/Äther kristallisiert. Ausbeute: 2,85 g (46,9 % d.Th.); Fp: 2o4-2o7°;

$[\alpha]_D^{25}$ = +5,5° (c=1/H_2O). Alle vier auf verschiedene Weise dargestellten Diamide besitzen in zwei Laufmitteln identische Rf-Werte: Symstem A 3 o,13; D = o,o5.



C 1 = 172,87
C 2 = 56,22
C 3 = 27,63
C 4 = 31,33
C 5 = 174,o7
C 6 = 142,92
C 7 = 129,69
C 8 = 126,83
C 9 = 138,43
C1o = 21,19

Fig. 14: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Tos-L-Gln-NH_2.

Derivate des L-Isoglutamins

Benzyloxycarbonyl-L-isoglutamin

(Z-L-Isogln), $C_{13}H_{16}N_2O_5$/28o,28

Variante A

68,4 mmol (18 g) Z-L-Glu-O werden nach Lit. [77] zum Z-L-Isogln umgesetzt. Ausbeute: 14,3 g (74 % d.Th.); Fp: 169-171°, Lit: 171-172°; $[\alpha]_D^{25}$ = -5,4° (c=2/MeOH), Lit: $[\alpha]_D^{25}$ = -4,6° (c=2,o3/MeOH).

Variante B

85,3 mmol (24 g) Z-L-Glu werden nach Ch.Ressler [78] zum Z-L-Isoglutamin umgesetzt. Ausbeute: 12,3 g (51 % d.Th.); Fp: 171-173°, Lit: $[\alpha]_D^{25}$ = -6,o6° (c=1,o4/MeOH), Lit: $[\alpha]_D^{19}$ = -6,o° (c=2/MeOH).

Elementaranalyse

ber: C = 55,71 % H = 5,75 % N = 9,99 %

gef: C = 55,31 % H = 5,74 % N = 9,63 %.

Beide Produkte sind dünnschichtchromatographisch identisch.

$Rf_{(D)}$ = o,21.

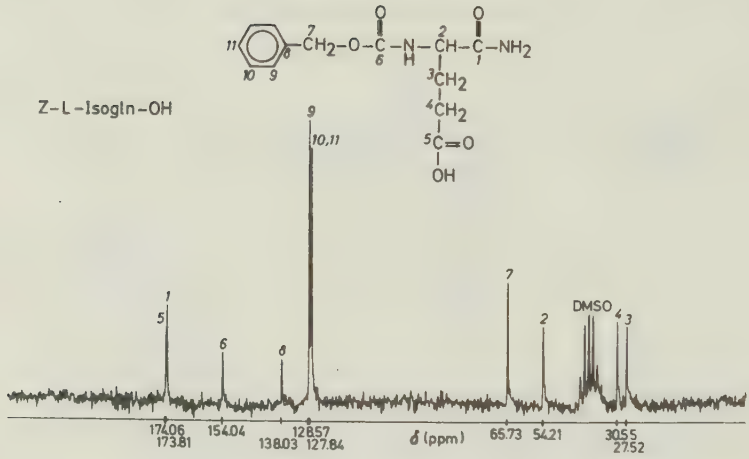


Abb. 37: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-L-Isogln

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-isoglutamin
(Boc-L-Isogln), $C_{10}H_{18}N_2O_5$/246,26

Diese Verbindung wird in Analogie zum entsprechenden Benzyloxycarbonyl-Derivat nach Variante A synthetisiert. Ansatz: 174,5 mmol (40g); Ausbeute nach Umkristallisation aus EtOH/n-Hexan: 23,5g (54% d.Th.); Fp: 156-158° [79]; $[\alpha]_D^{25}$= -2,87° (c=1,01/MeOH), Lit: $[\alpha]_D^{25}$= -3,1° (c=0,8/MeOH)

Elementaranalyse

ber: C = 48,77% H = 7,37% N = 11,38%

gef: C = 48,79% H = 7,47% N = 10,98%

L-Isoglutaminmethylester (Hydrochlorid)

Variante A

Benzyloxycarbonyl-L-isoglutaminmethylester
(Z-L-Isogln-OMe), $C_{14}H_{18}N_2O_5$/294,31

Die Darstellung erfolgt nach E. Klieger und H. Gibian[67].
Ansatz: 8,6 mmol (3,12g) Z-L-Glu(OMe)-OC_6H_5; Ausbeute: 1,7g

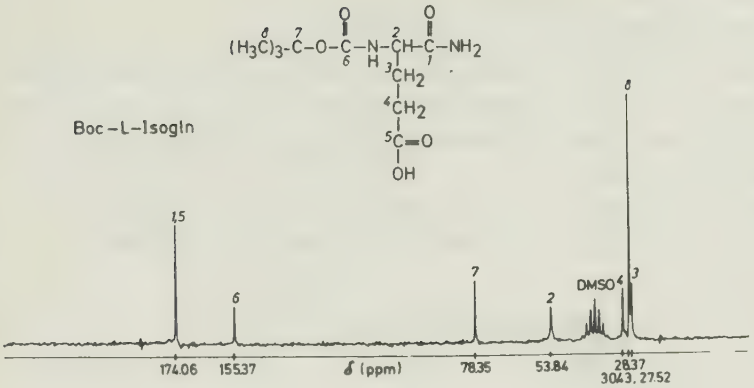


Abb. 38: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-L-Isogln.

(67,2% d.Th.); Fp: 115-117°, Lit: 116-117°; $[\alpha]_D^{25}$= -7,98° (c= 1,05/MeOH), Lit: $[\alpha]_D^{25}$= -7,0° (c=1,05/MeOH).

L-Isoglutaminmethylester (Hydrochlorid)
(L-Isogln-OMe.HCl), $C_6H_{13}N_2O_3Cl$/196,63

5,1 mmol (1,5g) Z-L-Isogln-OMe löst man in 50ml MeOH, versetzt mit einigen Tropfen H_2O und hydriert bei pH 4 an 200mg Palladium-Aktivkohle-Katalysator im Durchflußverfahren. Nach üblicher Aufarbeitung kristallisiert man aus EtOH und wenig H_2O durch Zugabe von Äther. Ausbeute: 0,6g (60% d.Th.); Fp: 201-203°; $[\alpha]_D^{25}$= +2,35° (c=1/MeOH).

Variante B

Benzyloxycarbonyl-L-isoglutaminmethylester

Die Synthese wird in Anlehnung an U. Weber[69] mit Z-L-Isogln und absolutem Methanol mittels DCC/HOBt-Kupplung ausgeführt. Ansatz: 25 mmol; Ausbeute: 5,3g (72% d.Th.);Fp: 113-116°; $[\alpha]_D^{25}$= -6,13° (c=1,06/MeOH).

Elementaranalyse

ber: C = 57,14% H = 6,16% N = 9,52%

gef: C = 57,69% H = 6,16% N = 9,57%

L-Isoglutaminmethylester (Hydrochlorid)
(L-Isogln-OMe.HCl), $C_6H_{13}N_2O_3Cl/196,63$

14 mmol (4,12g) Z-L-Isogln-OMe werden, wie bei A beschrieben, hydriert. Kristallisiert wird aus MeOH/Äther. Ausbeute: 2,1g (76,4% d.Th.); Fp: 188-191°; $[\alpha]_D^{25}$= +23,88° (c=0,85/DMF).
Elementaranalyse
ber: C = 36,65% H = 6,66% N = 14,25% Cl = 18,03%
gef: C = 35,71% H = 6,64% N = 14,21% Cl = 17,56%

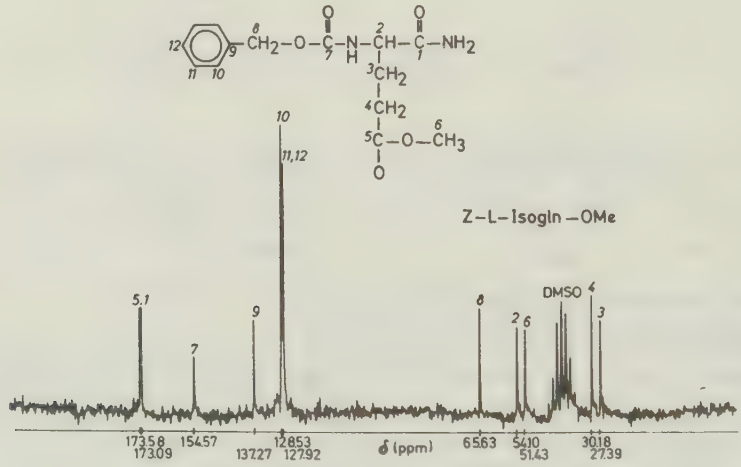


Abb. 39: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-L-Isogln-OMe.

L-Isoglutaminbenzylester

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-isoglutaminbenzylester
(Boc-L-Isogln-OBzl), $C_{17}H_{24}N_2O_5/336,39$

50 mmol (16,8g) Boc-L-Glu(OBzl)-OH werden in $CHCl_3$ gelöst, auf -25° gekühlt und mit 7,18ml Triäthylamin versetzt. Man tropft darauf 6,7ml Chlorameisensäureisobutylester zu, läßt die Temperatur bis auf -10° ansteigen, kühlt abermals auf -25° ab und fügt 10ml conc. NH_3 tropfenweise zu, wobei das Produkt weiß-voluminös ausfällt. Nach Umkristallisation aus MeOH/Äther beträgt die Ausbeute 10,2g (60% d.Th.). Fp: 115-117°; $[\alpha]_D^{25}$= +0,97° (c=1,0/MeOH).

Elementaranalyse

ber: C = 60,70% H = 7,19% N = 8,33%

gef: C = 59,86% H = 7,34% N = 8,06%

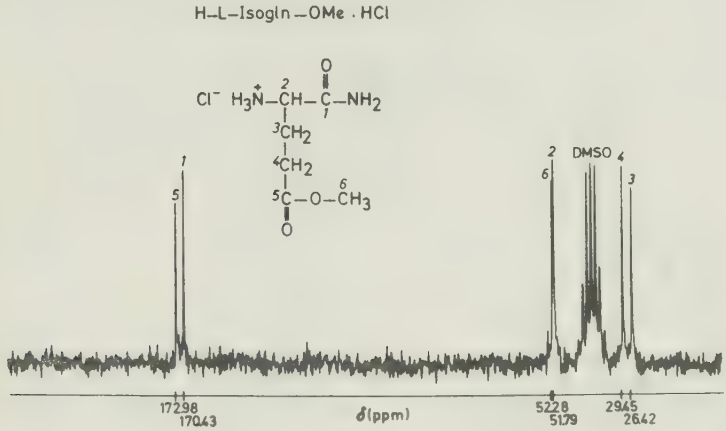


Abb. 40: ^{13}C-NMR-Spektrum von L-Isogln-OMe.HCl.

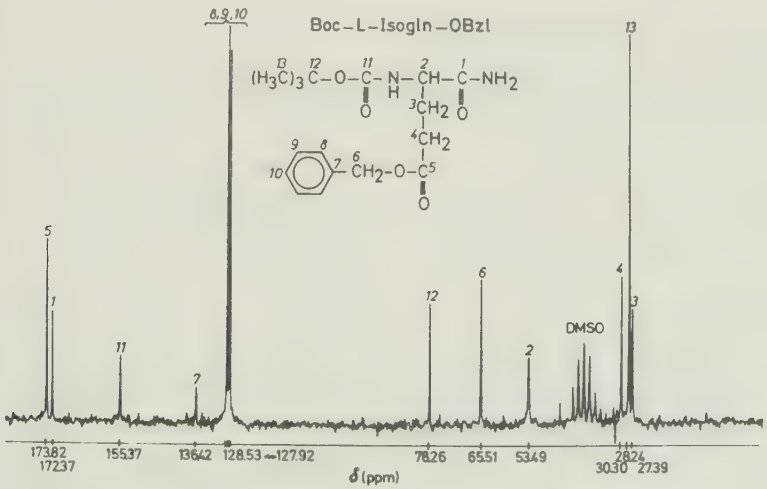
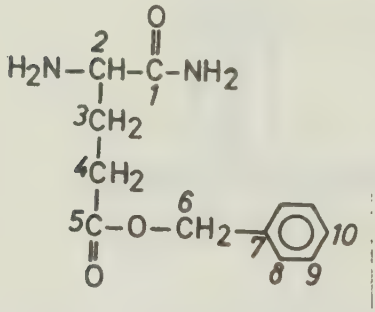


Abb. 41: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-L-Isogln-OBzl.

L-Isoglutaminbenzylester

(L-Isogln-OBzl), $C_{12}H_{16}N_2O_3$/236,27

8,9 mmol (3,0g) Boc-L-Isogln-OBzl werden in 50ml CH_2Cl_2/TFA (1:1) gelöst und für 1,5h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abziehen des Lösungsmittels nimmt man in EtOH auf, neutralisiert mit conc. NH_3 und fällt den Ester mit Äther/Petroläther. Man erhält ein Öl, das nach längerem Stehen wachsartig erstarrt. Ausbeute: 1,86g (88,6% d.Th.); $[\alpha]_D^{25}$= +14,2° (c=1,0/MeOH); $Rf_{(A)}$= 0,62 , $Rf_{(D)}$= 0,51 .



C 1 = 170,91
C 2 = 52,22
C 3 = 29,69
C 4 = 26,72
C 5 = 172,37
C 6 = 66,30
C 7 = 136,73
C 8 = 129,08
C 9 = 128,65
C10 = 127,14

Fig. 15: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von L-Isogln-OBzl.

Derivate der L-Pyroglutaminsäure

Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutaminsäure(Dicyclohexylammonium-Salz)

(Z-L-Pyr.DCHA), $C_{25}H_{36}N_2O_5$/444,57

Darstellung nach Lit. [65]. Ausbeute bei 1 molarem Ansatz nach Umkristallisation aus Methanol: 412 g (92,7 % d.Th.); Fp: 197-201°, Lit: 199-200° $[\alpha]_D^{25}$= -13,3° (c=0,94/$CHCl_3$), Lit: $[\alpha]_D^{25}$ = -17,4° (c=3,11/$CHCl_3$).

Elementaranalyse

ber: C = 67,54 % H = 8,16 % N = 6,26 %
gef: C = 67,15 % H = 8,19 % N = 6,09 %

Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutaminsäure

(Z-L-Pyr), $C_{13}H_{13}NO_5$/263,25

0,5 mol (222,25 g) Z-L-Pyr.DCHA werden nach Lit.[65] aus dem Salz freigesetzt. Ausbeute nach Kristallisation aus EE/PÄ: 84,3 g

(75,9 % d.Th.); Fp: 134°, Lit: 134-135°; $[\alpha]_D^{25}$ = -33,8° (c=1,o1/MeOH), Lit: $[\alpha]_D^{25}$ = -29,1° (c=1,o1/MeOH).

Elementaranalyse

ber: C = 59,31 % H = 4,97 % N = 5,32 %

gef: C = 59,62 % H = 5,o9 % N = 5,14 %

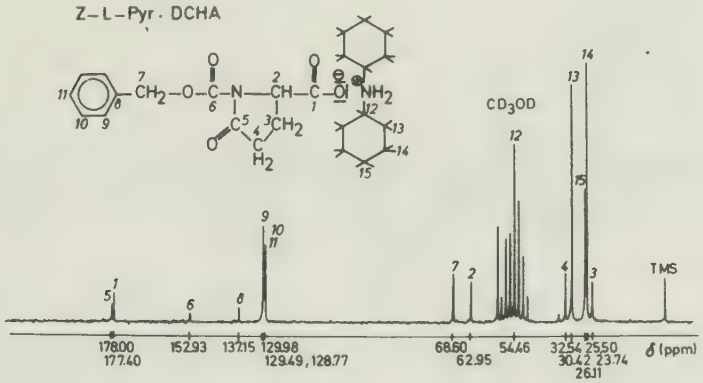


Abb. 42: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-L-Pyr-OH.DCHA.

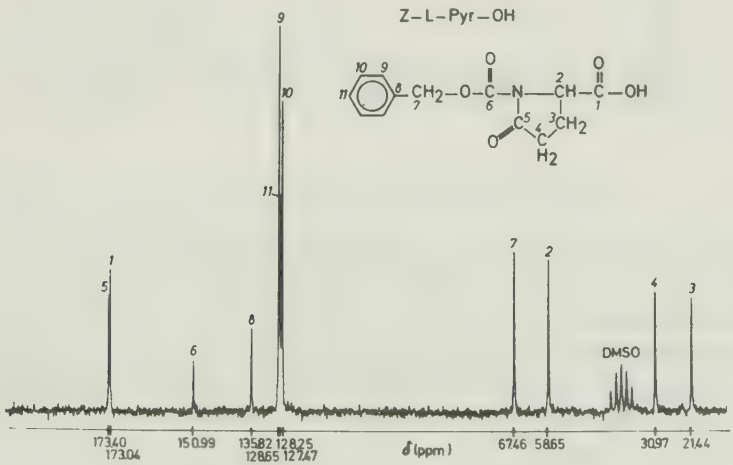


Abb. 43: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-L-Pyr-OH.

Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutaminsäure-N-hydroxysuccinimidester (Z-L-Pyr-ONSu), $C_{17}H_{16}N_2O_7$/36o,31

Die Darstellung erfolgt nach Kurath und Thomas [8o]. Ansatz: o,3 mol; Ausbeute: 78,5 g (72,6 % d.Th.); Fp: 132°; Lit: 131-132°; $[\alpha]_D^{25}$ = -23,8° (c= 1,o3/DMF), Lit: $[\alpha]_D^{25}$ = (c=1,8/DMF).

Elementaranalyse

ber:	C = 56,67 %	H = 4,47 %	N = 7,77 %
gef:	C = 56,47 %	H = 4,67 %	N = 8,28 %

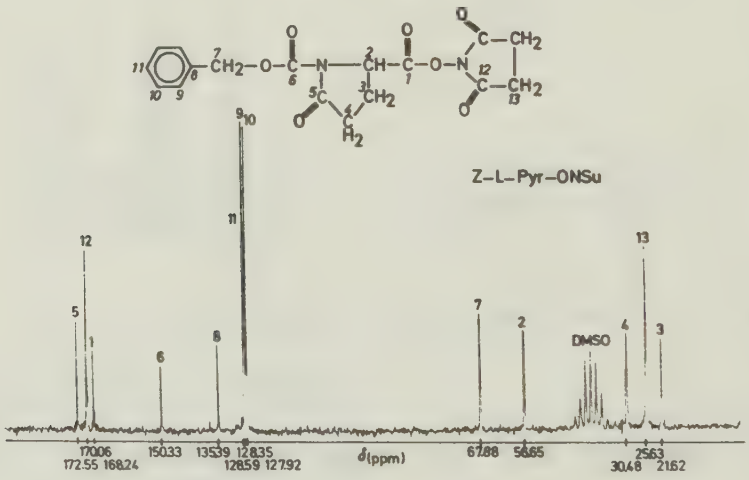


Abb. 44: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-L-Pyr-ONSu.

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-pyroglutaminsäure(Dicyclohexylammonium-Salz (Boc-L-Pyr.DCHA), $C_{22}H_{38}N_2O_5$/41o,55

Die Synthese verläuft nach Schröder und Klieger [51]. Ansatz: o,6 mol Boc-L-Glu-O; Ausbeute: 21o,o g (85,3 % d.Th.); Fp: 184-185°, Lit: 183-184°; $[\alpha]_D^{25}$= -13,3°(c=1/AcOH); Lit: $[\alpha]_D^{25}$ = -16,6° (c=1/AcOH).

Elementaranalyse

ber:	C = 64,36 %	H = 9,33 %	N = 6,82 %
gef:	C = 63,79 %	H = 9,31 %	N = 6,96 %

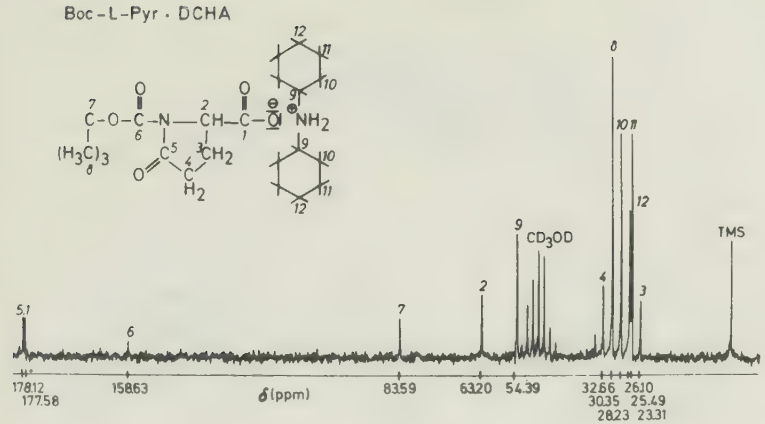


Abb.45: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-L-Pyr.DCHA.

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-pyroglutaminsäure (Boc-L-Pyr), $C_{10}H_{15}NO_5$/229,23

o,5 mol des Dicyclohexylamin-Salz werden nach Lit.[51] freigesetzt. Ausbeute nach Umkristallisation aus Äthanol 77,9 g (68 % d.Th.); $[\alpha]_D^{25}$ = -37,76° (c=o,98/AcOH), Lit: $[\alpha]_D^{25}$ = -35,3° (c=1/AcOH); Fp: 112-114°, Lit: 115-116°.

Elementaranalyse

ber: C = 52,39 % H = 6,59 % N = 6,11 %

gef: C = 5o,96 % H = 6,86 % N = 5,51 %

Toluolsulfonyl-L-pyroglutamylchlorid (Tos-L-Pyr-Cl), $C_{12}H_{12}NO_4Cl$/3o1,75

Die Synthese erfolgt nach Swan und du Vigneaud [76]. Ansatz: 166 mmol (5o g) Tos-L-Glu; Ausbeute: quantitativ. Da das Produkt sehr hydrolyseempfindlich ist, wird auf eine genauere physikalische Charakterisierung verzichtet. Fp: 72-74°, Lit: 71-74°.

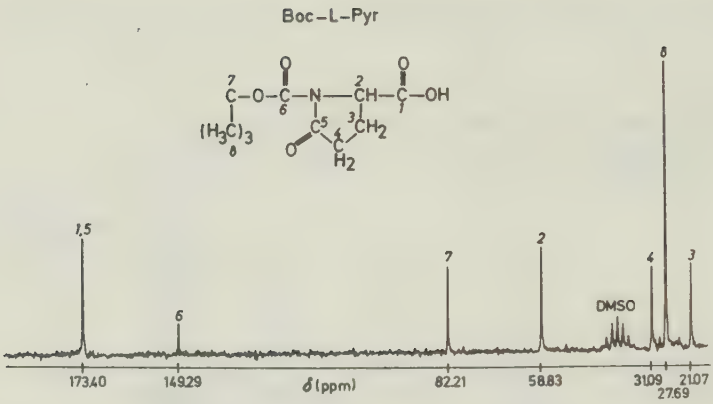


Abb.46: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-L-Pyr.

L-Pyroglutaminsäureäthylester
(L-Pyr-OEt), $C_7H_{11}NO_3$/157,17

2o8,6 mmol (5o g) L-Glu(OEt)-OEt werden nach E.Fischer und R.Boehner [63] zum L-Pyroglutaminsäureäthylester umgesetzt. Die Reinigung erfolgt durch Destillation. K_p (o,4 Torr) = 152-157°; Ausbeute: 23,6 g (72 % d.Th.) an DC-einheitlichem Öl. Kristallisation des Öls aus wenig Äthanol/Äther; glasig-weiße Kristalle; Fp: 55-56°, Lit: 54°; $[\alpha]_D^{25}$ = -o,52 (c=o,16/DMF), Lit: -2,47°.

Elementaranalyse

ber: C = 53,49 % H = 7,o5 % N = 8,91 %

gef: C = 52,49 % H = 7,24 % N = 8,62 %

L-Pyroglutaminsäureamid
(L-Pyr-NH_2), $C_5H_8N_2O_2$/128,13

Variante A

23,7 mmol (13,2 g) Z-L-Pyr.DCHA werden nach Lit.[65] über Z-Pyr-Cl zum Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutaminsäureamid umgesetzt. Nach Abziehen des Lösungsmittels nimmt man in MeOH/H_2O auf und hydriert an Palladium-Aktivkohle-Katalysator. Nach übli-

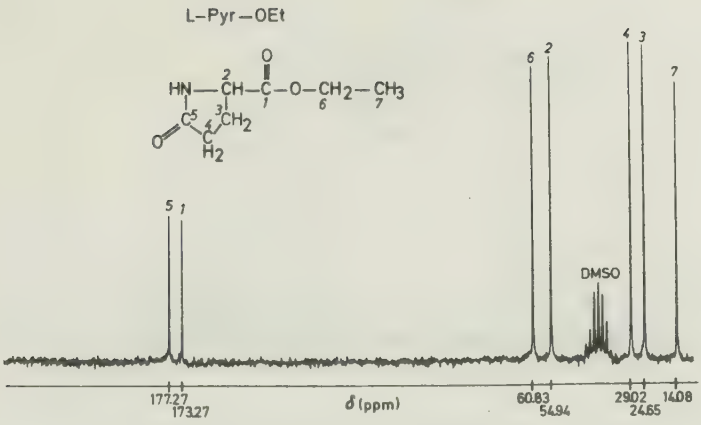


Abb.47: ^{13}C-NMR-Spektrum von L-Pyr-OEt.

cher Aufarbeitung wird aus MeOH/Äther kristallisiert. Ausbeute: 1,4 g (46 % d.Th.); Fp: 162-163°, Lit: 166-168°; $[\alpha]_D^{25}$ = -38° (c=2/H_2O), Lit: $[\alpha]_D^{25}$ = -42,2° (c=2/H_2O)

Variante B

164 mmol (39 g) L-Glu(OEt)-OEt.HCl werden nach Angier et al.[81] zum L-Pyroglutaminsäureamid umgesetzt. Ausbeute: 18,5 g (71 % d.Th.); Fp: 156°, Lit: s.o.; $[\alpha]_D^{25}$= -39° (c=2/H_2O), Lit: s.o.

Elementaranalyse

ber: C = 45,45 % H = 6,06 % N = 21,21 %

gef: C = 44,16 % H = 6,59 % N = 21,19 %

L-Pyroglutaminsäure-2,4,5-trichlorphenylester

(L-Pyr-OTCP), $C_{11}H_8NO_3Cl_3$/308,55

Darstellung erfolgt nach J.C.Anderson [82]. Ansatz: 0,1 mol L-Pyroglutaminsäure; Ausbeute: 23,4 g (75,8 % d.Th.); Fp: 158-160°, Lit: 158-160°; $[\alpha]_D^{25}$ = +18,78 ° (c=1,02/DMF), Lit: +18,4° (c=1,6/DMF)

Elementaranalyse

ber: C = 48,82 % H = 2,61 % N = 4,54 % Cl = 33,50 %

gef: C = 48,73 % H = 2,82 % N = 4,46 % Cl = 32,94 %

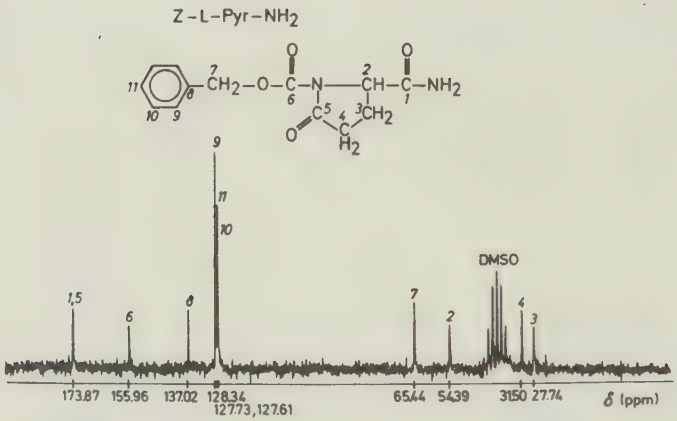


Abb.48: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-L-Pyr-NH_2.

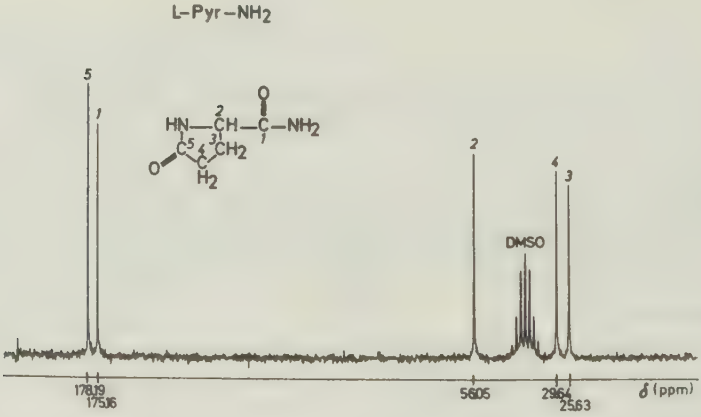


Abb.49: ^{13}C-NMR-Spektrum von L-Pyr-NH_2.

Derivate des L-Phenylalanins

L-Phenylalaninmethylester(Hydrochlorid)

(L-Phe-OMe.HCl), $C_{10}H_{14}NO_2Cl$/215,67

Die Darstellung geschieht nach R.A.Boissonnas et al.[83].

Ansatz: 1,1 mol L-Phenylalanin; Ausbeute: 218,5 g (92 % d.Th.);

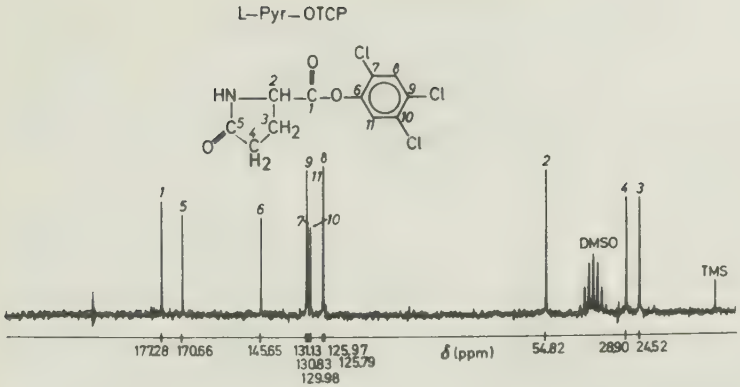


Abb. 5o: ^{13}C-NMR-Spektrum von L-Pyr-OTCP.

Fp: 16o-162°, Lit: 16o° [83], (bzw: 159-161°) [84]; $[\alpha]_D^{25}$ = +27,3°(c=1/AcOH), Lit: -4,6° (c=5/H_2O)

Elementaranalyse

ber: C = 55,59 % H = 6,58 % N = 6,49 % Cl = 16,43 %

gef: C = 55,3o % H = 6,54 % N = 6,21 % Cl = 16,58 %

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanin-2,4,5-trichlorphenyl-ester

(Boc-L-Phe-OTCP), $C_{2o}H_{2o}NO_4Cl_3$/444,74

Die Verbindung wird nach J.Pless und R.A.Boissonnas synthetisiert [33]. (Methode A). Ansatz: 56,5 mmol Boc-L-Phe; Ausbeute: 2o,1 g (79,9 % d.Th.); Fp: 122°, Lit: 122°; $[\alpha]_D^{25}$= -26,4° (c=1/DMF), Lit: -27° (c=2/DMF)

Elementaranalyse

ber: C = 54,o1 % H = 4,53 % N = 3,15 % Cl = 23,91 %

gef: C = 53,54 % H = 4,36 % N = 2,91 % Cl = 24,o1 %

L-Phenylalaninamid(Hydrochlorid)

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-phenylalaninamid

(Boc-L-Phe-NH_2), $C_{14}H_{2o}N_2O_3$/264,32

o,1 mol (26,5 g) Boc-L-Phe werden in 25o ml $CHCl_3$ (abs.) gelöst und mit o,11 mol Triäthylamin (15,3 ml) versetzt.

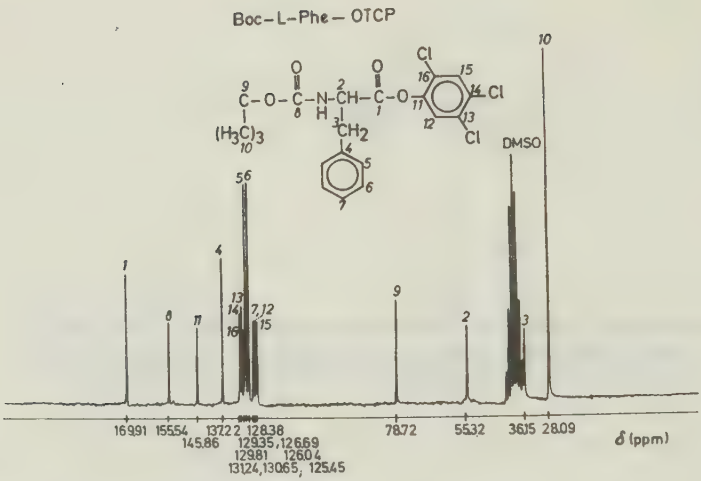


Abb.51: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-L-Phe-OTCP.

Nachdem die Lösung auf -1o° abgekühlt ist, tropft man o,11 mol (15 ml) Chlorameisensäureisobutylester zu, rührt für 15 Minuten und aminolysiert das gemischte Anhydrid mit conc. NH_3-Lösung. Nach 2 1/2 Stunden bei Raumtemperatur trennt man die organische Phase ab, wäscht sauer sowie alkalisch und kristallisiert aus $CHCl_3$/PÄ. Ausbeute: 21,4 g (81 % d.Th.); Fp: 141-142°, Lit 14o° [85]; $[\alpha]_D^{25}$ = +2,28° (c=2,19/AcOH), Lit: $[\alpha]_D^{23}$ = -2,4(c=1/DMF) [85]

Elementaranalyse

ber: C = 63,58 % H = 7,63 % N = 1o,6o %

gef: C = 63,28 % H = 7,71 % N = 1o,74 %

L-Phenylalaninamid-Hydrochlorid

(L-Phe-NH_2.HCl), $C_9H_{13}N_2OCl$/2oo,67

7o mmol (18,4 g) Boc-L-Phe-NH_2 werden mit 2oo ml 1,2 n HCl/AcOH für 3o Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Darauf zieht man das Lösungsmittel ab, nimmt in MeOH auf und engt erneut bis zum Öl ein. Diese Operation wird noch zweimal mit Äther wiederholt. Kristallisation des Produkts erfolgt aus MeOH/Äther. Ausbeute:

1o,6 g (75,4 % d.Th.) , Fp: 242-245°,Lit: 25o° [85]; $[\alpha]_D^{25}$ = +42,54° (c=1,14/AcOH), Lit: $[\alpha]_D^{23}$ = +27,0° (c=o,5/DMF) [85].

Elementaranalyse

ber: C = 53,87 % H = 6,53 % N = 13,96 % Cl = 17,67 %

gef: C = 54,47 % H = 6,76 % N = 13,22 % Cl = 18,26 %

Derivate des L-Prolins

L-Prolinmethylester(Hydrochlorid)

(L-Pro-OMe.HCl), $C_6H_{12}NO_2Cl$/165,62

Die Darstellung erfolgt nach B.F.Erlanger et al.[86]. Ansatz: 1,2 mol; Ausbeute: 155g (78%d.Th.) Es gelang nicht, den Ester zu kristallisieren; es konnte lediglich ein wachsartiges Produkt erhalten werden.

$Rf_{(A)}$ = o,31, $Rf_{(D)}$ = o,49.

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-prolin-2,4,5-trichlorphenylester

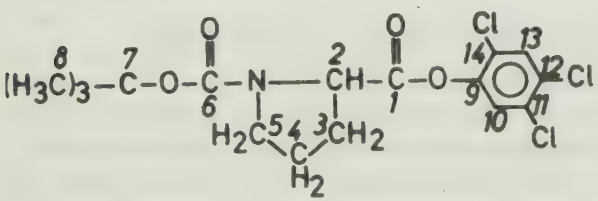
(Boc-L-Pro-OTCP), $C_{16}H_{18}NO_4Cl_3$/394,68

Durchführung der Reaktion nach W.Broadbent et al. [87]. Ansatz: 9o mmol (19,35 g) Boc-L-Prolin. Nach Kristallisation aus Petroläther beträgt die Ausbeute: 24,6 g (69,3 % d.Th.); Fp: 66°, Lit: 54-55°; $[\alpha]_D^{25}$ = -44,6 (c=o,93/MeOH)

Elementaranalyse

ber: C = 48,69 % H = 4,6o % N = 3,55 % Cl = 26,95 %

gef: C = 48,12 % H = 4,37 % N = 3,34 % Cl = 27,o8 %



C 1 = 17o,o6
C 2 = 58,54
C 3 = 3o,37
C 4 = 23,14
C 5 = 46,39
C 6 = 152,94
C 7 = 79,42

C 8 = 28,o6; C 9 = 145,66; C 1o = 125,56; C 11 = 13o,78; C12 = 131,33; C 13 = 125,97; C14 = 129,87.

Fig.16: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Boc-L-Pro-OTCP.

L-Prolinamid(Hydrochlorid)
N-tert-Butyloxycarbonyl-L-prolinamid
(Boc-L-Pro-NH_2), $C_{10}H_{18}N_2O_3$/214,27

Synthese analog der entsprechenden Phenylalaninverbindung. Ansatz: o,8 mol Boc-L-Prolin. Nach Umkristallisation aus MeOH/Äther/PÄ beträgt die Ausbeute 152,7 g (89,1 % d.Th.); Fp: 1o7°, Lit: 1o5-1o6° [88]; $[\alpha]_D^{25}$ = -62,8° (c=1/MeOH), Lit: $[\alpha]_D^{2o}$ = -63° (c=1/MeOH) [88].

Elementaranalyse
ber: C = 56,o4 % H = 8,47 % N = 13,o7 %
gef: C = 55,99 % H = 8,59 % N = 13,21 %

L-Prolinamid(Hydrochlorid)
(L-Pro-NH_2.HCl), $C_5H_{11}N_2OCl$/15o,61

o,56 mol (12o g) Boc-L-Pro-NH_2 werden analog dem Phenylalaninderivat mit 16oo ml 1,2n HCl/AcOH deblockiert. Kristallisation aus MeOH/EE.
Ausbeute: 81,6 g (97 % d.Th.); Fp: 178-181°, Lit: 179-181° [89]; $[\alpha]_D^{25}$ = -67,27° (c=1,39/EtOH), Lit: -68,4° (c=2/EtOH), bzw. -7o,7° (c=2/EtOH) [9o].

3. L-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-prolinamid (Phe^2-TRH)
(L-Pyr-L-Phe-L-Pro-NH_2)

Syntheseweg I
N-tert-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-prolinamid
(Boc-L-Phe-L-Pro-NH_2), $C_{19}H_{27}N_3O_4$/361,44

153,1 mmol (4o,6 g) Boc-L-Phenylalanin werden mit äquimolaren Mengen L-Prolinamid-Hydrochlorid, HOBt und N-Äthylmorpholin in DMF gelöst. Man kühlt auf -5 bis -1o° ab, versetzt mit einer äquimolaren, gekühlten Lösung von DCC in DMF, rührt 2 h in der Kälte und läßt dann noch 12 h bei Raumtemperatur reagieren. Darauf filtriert man vom Dicyclohexylharnstoff ab, engt bis zum Öl ein, nimmt in EE und wenig EtOH auf und kühlt

für 3 h auf -5° um restlichen Dicyclohexylharnstoff zu fällen. Nach saurem und alkalischem Waschen der organischen Phase wird durch Na_2SO_4 filtriert und erneut bis zum Öl eingeengt, das aus EtOH kristallisiert wird. Ausbeute: 37,1 g (67 % d.Th.), Fp: 78-81°; $[\alpha]_D^{25}$ = -34,o6° (c=1,38/AcOH).

Elementaranalyse

ber: C = 63,14 % H = 7,53 % N = 11,62 %

gef: C = 61,91 % H = 7,88 % N = 11,12 %

L-Phenylalanyl-L-prolinamid(Hydrochlorid)

(L-Phe-L-Pro-NH_2.HCl), $C_{14}H_{2o}N_3O_2Cl$/297,78

64,5 mmol (23,3 g) Boc-L-Phe-L-Pro-NH_2 werden in 2oo ml 1,2n HCl/AcOH gelöst und 35 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend zieht man am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel ab, nimmt noch zweimal in absolutem MeOH auf, engt jeweils wieder ein und kristallisiert das erhaltene Öl aus MeOH/Äther. Ausbeute: 17,4 g (9+,6 % d.Th.); Fp: ab 62° unter Zersetzung; $[\alpha]_D^{25}$ = -11,62° (c=o,96/AcOH).

Elementaranalyse

ber: C = 56,47 % H = 6,77 % N = 14,11 %

gef: C = 53,84 % H = 6,87 % N = 12,73 %

L-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-prolinamid

(L-Pyr-L-Phe-L-Pro-NH_2), $C_{19}H_{24}N_4O_4$/372,42

4 mmol (1,1 g) Boc-L-Glu(OEt)-OH werden in absolutem $CHCl_3$ gelöst, auf -2o° gekühlt und mit der äquimolaren Menge (o,56 ml) Triäthylamin versetzt. Darauf tropft man bei gleicher Temperatur 4 mmol (o,52 ml) Chlorameisensäureisobutylester zu, rührt für weitere 15 Minuten und versetzt dann mit 4 mmol (1,19 g) L-Phe-L-Pro-NH_2.HCl und o,56 ml Triäthylamin, gelöst in $CHCl_3/H_2O$. Man läßt auf Raumtemperatur erwärmen , rührt für weitere 4 h und trennt anschließend die Wasserphase ab. Die organische Phase wird zweimal sauer und alkalisch gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und bis zum Öl eingeengt. Das geschützte Tripeptidamid ($Rf_{(D)}$=o,81) wird ohne weitere Charakterisierung mit

Trifluoressigsäure in CH_2Cl_2 deblockiert ($Rf_{(D)}$=o,27) und nach Abziehen des Lösungsmittels mit 35 ml NH_3-Lösung (conc.) versetzt. Man rührt dann für 24 h bei Raumtemperatur. Nach dieser Zeit läßt sich der Ester dünnschichtchromatographisch praktisch nicht mehr nachweisen. Die neu entstandene, ninhydrinnegative Verbindung wird mit Hilfe einer Referenzsubstanz als L-Pyr-L-Phe-L-Pro-NH_2 identifiziert ($Rf_{(A)}$=o,44). Man engt bis zum Öl eintrocknet scharf im Ölpumpenvakuum und kristallisiert aus EtOH/Äther. Ausbeute: o,48 g (52,7 % d.Th., bezogen auf Boc-L-Glu(OEt)-L-Phe-L-Pro-NH_2); Fp: 183-187°, Lit: 194-197° [17].

Anmerkung: Setzt man anstelle des Äthylesters den Methylester ein, so ist die Cyclisierung nach 24 h in wäßrigem Ammoniak nur zu ca. 5o % gelaufen. Erst bei Verwendung von flüssigem Ammoniak läßt sich während 24 h ein weitgehender (nicht vollständiger) Ringschluß zur Pyroglutaminsäure erreichen.

Syntheseweg II

Benzyloxycarbonyl-(4,4'-dimethoxybenzhydryl)-L-glutaminyl-L-phenylalanyl-L-prolinamid

(Z-L-Gln(Mbh)-L-Phe-L-Pro-NH_2), $C_{42}H_{47}O_8N_5$/749,86

5 mmol (1,49 g) L-Phe-L-Pro-NH_2.HCl werden mit äquimolaren Mengen Z-L-Gln(Mbh)-OH (2,53 g), HOBt (o,68 g), N-Äthylmorpholin (o,63 ml) und DCC (1,o3 g) wie bereits beschrieben zum entsprechenden geschützten Tripeptidamid umgesetzt. Nach üblicher Aufarbeitung (vgl. Synthese von Boc-L-Phe-L-Pro-NH_2) wird das Peptid aus EE durch Zusatz von Petroläther gefällt. Ausbeute: 2,4 g (64 % d.Th.); Fp: 1o6-1o9°, Lit: 1o5-1o7° [19]; $[\alpha]_D^{25}$ = -18,1° (c=1,o4/DMF), Lit: $[\alpha]_D^{2o}$= -17,6° (c=1/DMF).

Elementaranalyse

ber: C = 67,27 % H = 6,31 % N = 9,34 %

gef: C = 66,35 % H = 6,52 % N = 9,31 %

L-Pyr-L-Phe-L-Pro-NH_2

1,33 mmol (1 g) Z-L-Gln(Mbh)-L-Phe-L-Pro-NH_2 werden in 25 ml Trifluoressigsäure/Anisol (9:1) für 9o Minuten unter Rück-

flußkühlung erhitzt. Man engt bis zum Öl ein, trocknet 24 h im Hochvakuum über KOH, nimmt in Aqua dest. auf, extrahiert zweimal mit Äther, entfärbt die rötliche wäßrige Lösung durch längeres Rühren mit Aktivkohle, filtriert ab und engt abermals bis zum Öl ein. Der ölig-amorphe Rückstand wird aus EtOH/Äther kristallisiert. Ausbeute: 156 mg (31,2 % d.Th.); Fp: 181-4°, Lit: 194-197° bzw. 143-145° [19]; $[\alpha]_D^{25}$ = -25,47° (c=1,5/MeOH), Lit: $[\alpha]_D^{22}$ = -44° (c=1,56/MeOH).

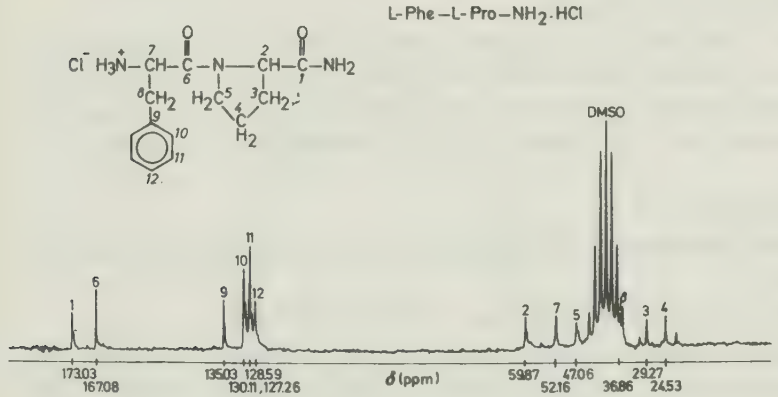


Abb.52: ^{13}C-NMR-Spektrum von L-Phe-L-Pro-NH_2.HCl

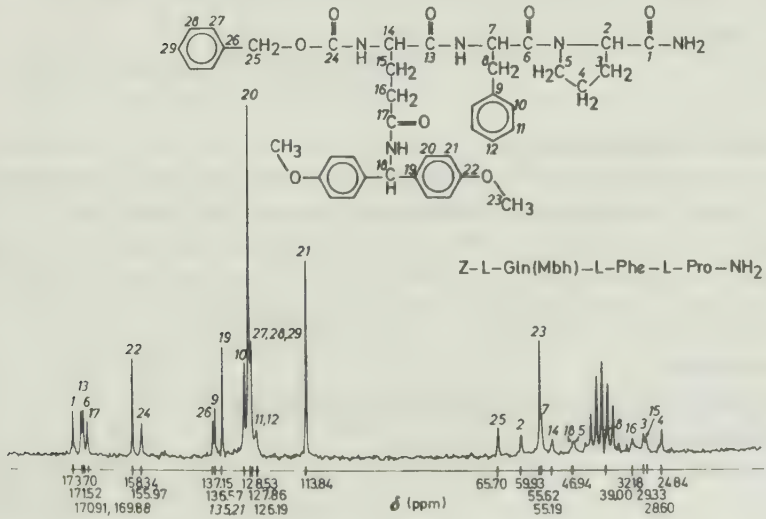


Abb.53: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-L-Gln(Mbh)-L-Phe-L-Pro-NH_2.

Syntheseweg III

L-Pyr-L-Phe-L-Pro-NH_2

5 mmol (1,23 g) L-Pyr-OTCP, 5 mmol (1,57 g) L-Phe-L-Pro-NH_2.HCl und 5 mmol (o,63 ml) N-Äthylmorpholin werden in 2o ml absolutem DMF gelöst und für 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Man zieht das Lösungsmittel ab, nimmt in H_2O auf und reinigt das Produkt in mehreren Läufen an Sephadex G-1o mit H_2O als Elutionsmittel. Endausbeute an lyophilisiertem Phe^2-TRH: 214 mg (11,51 % d.Th.); Fp: 149-155°; $[\alpha]_D^{25}$ = -32,93° (c=1,5/MeOH).

Ein 1 mmolarer Ansatz wurde analog unter Zusatz katalytischer Mengen (5o mg) HOBt ausgeführt. Da sich im Dünnschichtchromatogramm jedoch keine nennenswerte Ausbeutensteigerung feststellen ließ, wurde auf die Aufarbeitung verzichtet.

Syntheseweg IV

Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-prolinamid

(Z-L-Pyr-L-Phe-L-Pro-NH_2), $C_{27}H_{31}N_4O_6$/5o7,57

5 mmol (1,8 g) Z-L-Pyr-ONSu werden mit 5 mmol (1,57 g) L-Phe-L-Pro-NH_2.HCl und o,63 ml N-Äthylmorpholin für 24 h in DMF bei Raumtemperatur gerührt. Man engt bis zum Öl ein, nimmt in EE auf, wäscht sauer und alkalisch, trocknet und engt erneut bis zum Öl ein. Kristallisation des geschützten Tripeptidamids aus absolutem Äther. Ausbeute: 1,17 g (46 % d.Th.); Fp: ab 71° unter Zers. $[\alpha]_D^{25}$ = -7o,88° (c=o,99/MeOH)

L-Pyr-L-Phe-L-Pro-NH_2

o,99 mmol (5oo mg) Z-L-Pyr-L-Phe-L-Pro-NH_2 werden in MeOH/H_2O an 1oo mg Palladium-Aktivkohle-Katalysator bei pH 4 hydriert. Nach üblicher Aufarbeitung kristallisiert man aus EtOH/Äther. Ausbeute: 31o mg (83,8 % d.Th.); Fp: 186-189°; $[\alpha]_D^{25}$ = -42,3° (c=1,37/MeOH), bzw. -47,2° (c=o,88/AcOH).

Syntheseweg V

Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-prolinamid

(Z-L-Phe-L-Pro-NH_2), $C_{22}H_{25}N_3O_4$/395,46

2o,o5 mmol (6,o g) Z-L-Phe, 2o,o5 mmol (3,o2 g) L-Pro-NH_2.HCl,

2,54 ml N-Äthylmorpholin und 2,71 g HOBt werden in DMF, wie bereits beschrieben, unter Zuhilfenahme von DCC zum entsprechenden geschützten Dipeptidamid umgesetzt. Nach herkömmlicher Aufarbeitung kristallisiert man aus EE/PÄ. Ausbeute: 6,4 g (8o,7 % d.Th.); Fp: ab 58° unter Zers.; $[\alpha]_D^{25}$ = -29,37° (c=1,o3/AcOH).

Elementaranalyse

ber: C = 66,82 % H = 6,37 % N = 1o,63 %

gef: C = 66,49 % H = 6,4o % N = 1o,27 %

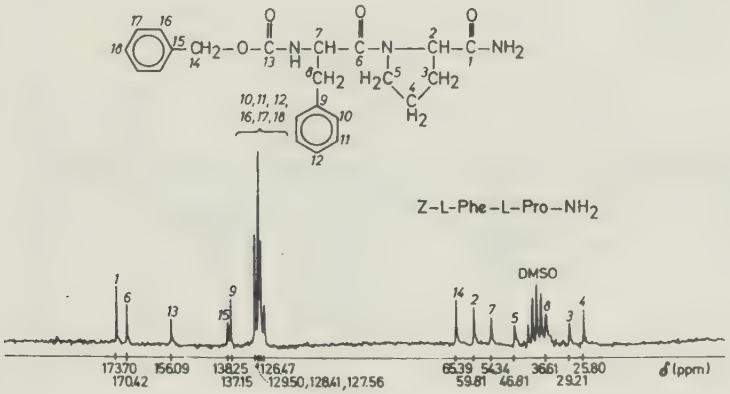


Abb.54: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-L-Phe-L-Pro-NH_2.

L-Phenylalanyl-L-prolinamid.HCl

(L-Phe-L-Pro-NH_2.HCl), $C_{14}H_{2o}N_3O_2Cl$/297,78

14,67 mmol (5,8 g) Z-L-Phe-L-Pro-NH_2 werden, wie bereits beschrieben, an 1 g Katalysator hydriert. Kristallisation erfolgt aus MeOH/Äther. Ausbeute: 4,2 g (96 % d.Th.); Fp: ab 64° unter Zers., $[\alpha]_D^{25}$ = -11,22° (c=o,81/AcOH).

Elementaranalyse

ber: C = 53,25 H = 7,o2 % N = 13,37 % (als Monohydrat)

C = 56,47 % H = 6,77 % N = 14,11 % Cl = 11,91 %

gef: C = 52,82 % H = 6,72 % N = 12,74 % Cl = 11,49 %

Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-prolin-amid

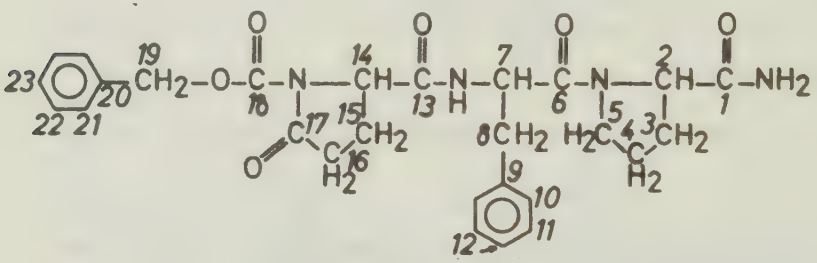
(Z-L-Pyr-L-Phe-L-Pro-NH_2), $C_{27}H_{31}N_4O_6$/5o7,57

13,43 mmol (3,45 g) Z-L-Pyr und 13,43 mmol (4 g) L-Phe-L-Pro-NH_2.HCl werden mittels N-Äthylmorpholin, HOBt und DCC (äquimolar) zum geschützten Tripeptidamid gekuppelt. Nach üblicher Aufarbeitung wird aus EE/PÄ kristallisiert. Ausbeute: 4,5 g (66 % d.Th.); Fp: ab 74° unter Zers.; $[\alpha]_D^{25}$ = -69,8° (c=1,o4/Me.

Elementaranalyse

ber: C = 63,89 % H = 6,16 % N = 11,o4 %

gef: C = 63,37 % H = 6,27 % N = 1o,57 %.



C 1 = 173,66; C 2 = 59,87; C 3 = 29,33; C 4 = 24,65;
C 5 = 46,94; C 6 =171,o9; C 7 = 52,52; C 8 = 36,33,
C 9 = 135,94; C 13 = 169,94; C 14 = 59,o2; C 15 = 22,23;
C16 = 31,o9; C 17 = 173,88; C 18 =15o,69; C 19 = 67,o3;
C2o = 137,94; C 1o,11,12,21,22,23 =129,44; 128,59; 128,41; 128,23; 127,68; 126,89; 126,59.

Fig. 17: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Z-L-Pyr-L-Phe-L-Pro-NH_2.

Bei Verwendung von Boc-L-Pyr und DCC als Kupplungsreagenz läßt sich das Tripeptidamid Boc-L-Pyr-L-Phe-L-Pro-NH_2 ($C_{24}H_{32}N_4O_6$/472,55) bei 1,5 mmolarem Ansatz in 77,5 % Ausbeute darstellen. Fp: 73-77°; $[\alpha]_D^{25}$ = -28,7° (c=1,o1/DMF).

L-Pyr-L-Phe-L-Pro-NH_2

1,97 mmol (1 g) Z-L-Pyr-L-Phe-L-Pro-NH_2 werden, wie beschrieben, an 200 mg Katalysator hydriert und aufgearbeitet. Ausbeute: 582 mg (79,73 % d.Th.); Fp: 182-185°; $[\alpha]_D^{25}$ = -43,06° (c=1,46/MeOH) bzw. -47,9° (c=0,96/AcOH), Lit: -44,0° (c=1,56/MeOH) [17] bzw. -49,3° (c=1/AcOH) [18].

Elementaranalyse

ber: C = 55,87 % H = 5,92 % N = 13,72 % (für 2 H_2O)
C = 61,28 % H = 6,50 % N = 15,04 %
gef: C = 48,83 % H = 6,16 % N = 13,79 %

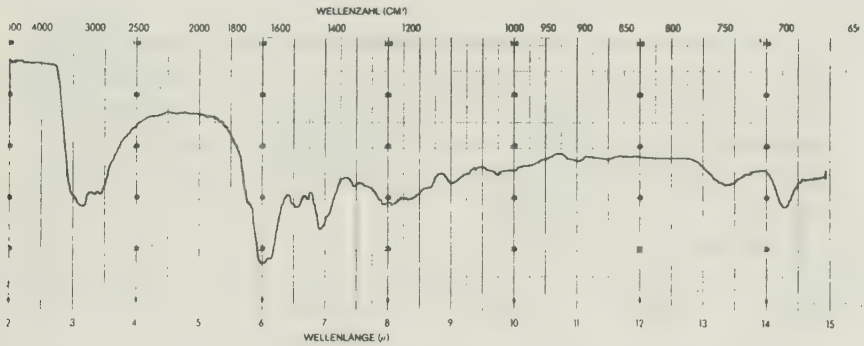


Abb. 55: IR-Spektrum von Phe^2-TRH;
^{13}C-NMR-Spektrum vgl. S.11

Das Massenspektrum von Phe^2-TRH zeigt die charakteristischen Ionen mit den Massen 84^+, 112^+, 113^+, 118^+, 141^+, 146^+, 231^+, 259^+, 287^+. Außerdem ist das Molekülion mit der Masse 372^+ intensiv vorhanden. Weitere Fragmente mit den Massen 83^+, 111^+, 230^+ und 258^+ werden in Kürze in einer Publikation ausführlich diskutiert.

4. L-Pyroglutamyl-L-prolyl-L-phenylalaninamid

Diese Sequenz wird nach den bisher beschriebenen Synthesestrategien II, III, IV und V dargestellt, indem das Dipeptidamid L-Pro-L-Phe-NH_2.HCl mit dem entsprechenden Pyroglutaminsäure- bzw. Glutaminderivat gekuppelt wird.

L-Prolyl-L-phenylalaninamid.HCl

Die Synthese dieses Dipeptidamids erfolgt auf zwei Wegen.

Variante A

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-phenylalaninamid

(Boc-L-Pro-L-Phe-NH_2), $C_{19}H_{27}N_3O_4$/361,44

15o mmol (32,29 g) Boc-L-Prolin und 15o mmol (3o,o9 g) L-Phe-NH_2.HCl werden in 2o ml absolutem DMF bei -15° mittels äquimolarer Mengen N-Äthylmorpholin, HOBt und DCC, wie bereits beschrieben, zum entsprechenden Dipeptidamid gekuppelt und aufgearbeitet. Nach Kristallisation aus EE/PÄ beträgt die Ausbeute 3o,9 g (57 % d.Th.); Fp: 143-145; $[\alpha]_D^{25}$ = -76,2° (c=1/AcOH).

Elementaranalyse

ber: C = 63,14 % H = 7,53 % N = 11,63 %

gef: C = 63,44 % H = 7,94 % N = 11,57 %

L-Prolyl-L-phenylalaninamid.HCl

(L-Pro-L-Phe-NH_2.CHl), $C_{14}H_{2o}N_3O_2Cl$/297,78

53,3 mmol (2o g) Boc-L-Pro-L-Phe-NH_2 werden mit 2oo ml 1,2 n HCl/AcOH innerhalb 3o Minuten bei Raumtemperatur deblockiert. Nach üblicher Aufarbeitung beträgt die Ausbeute nach Kristallisation aus MeOH/Äther 15,8 g (95,9 % d.Th.); Fp: ab 86° unter Zers.; F $[\alpha]_D^{25}$ = -29,1 (c=o,81/AcOH).

Variante B

Benzyloxycarbonyl-L-prolyl-L-phenylalaninamid

(Z-L-Pro-L-Phe-NH_2), $C_{22}H_{25}N_3O_4$/395,46

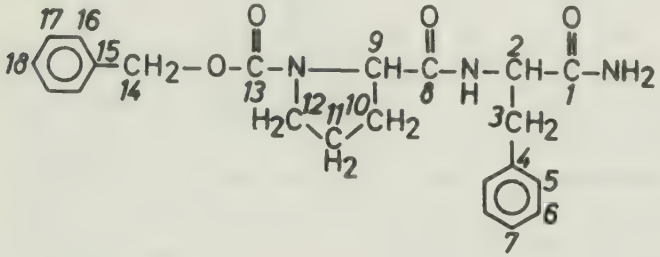
4o,12 mmol (1o g) Z-L-Pro werden in absolutem $CHCl_3$ gelöst, auf -2o° gekühlt und mit 4o,12 mmol (5,64 ml) Triäthylamin versetzt. Darauf tropft man unter starkem Rühren 4o,12 mmol (5,26 ml) Chlorameisensäureisobutylester zu, läßt 15 Minuten bei

-15^{o} reagieren, kühlt abermals bis auf $-2o^{o}$ ab und tropft dann rasch eine Lösung von 4o,12 mmol (8,o5 g) L-Phe-NH_2. HCl in $CHCl_3/H_2O$ zu. Nach zehnminütiger Reaktionszeit bei $-2o^{o}$ entfernt man die Kühlung und zieht das Lösungsmittel ab. Man nimmt in EE auf, wäscht sauer sowie alkalisch, trocknet die organische Phase und kristallisiert aus EE durch Zusatz von PÄ. Ausbeute: 11,4 g (71 % d.Th.); Fp: 162-166°; $[\alpha]_D^{25} = -42,44^{o}$ (c= o,88/AcOH).

Elementaranalyse

ber: C = 66,82 % H = 6,37 % N = 1o,63 %

gef: C = 62,61 % H = 8,53 % N = 1o,54 %



C 1 = 172,96; C 2 = 53,84; C 3 = 37,47; C 4 = 137,o6; C 8 = 171,75; C 9 = 59,67; C1o = 31,28; C11 = 23,88; C12 = 46,93; C13 =153,99; C14 = 65,97;nC15 = 138,15; C 5, 6, 7, 16, 17, 18 = 129,17; 128,32; 127,96; 127,47; 126,26.

Fig. 18: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Z-L-Pro-L-Phe-NH_2.

L-Prolyl-L-phenylalaninamid.HCl

2o,2 mmol (8 g) Z-L-Pro-L-Phe-NH_2 werden wie beschrieben an 1,6 g Katalysator bei pH = 4 hydriert. Kristallisation aus MeOH/Äther. Ausbeute: 5,4 g (89,7 % d.Th.), Fp: ab 86° unter Zers.; $[\alpha]_D^{25} = -29,9^{o}$ (c=o,98/AcOH).

Elementaranalyse

ber: C = 53,25% H = 7,o2% N = 13,31%(als Monohydrat)

C = 56,47% H = 6,77% N = 14,11%

gef: C = 53,59% H = 6,88% N = 12,37%

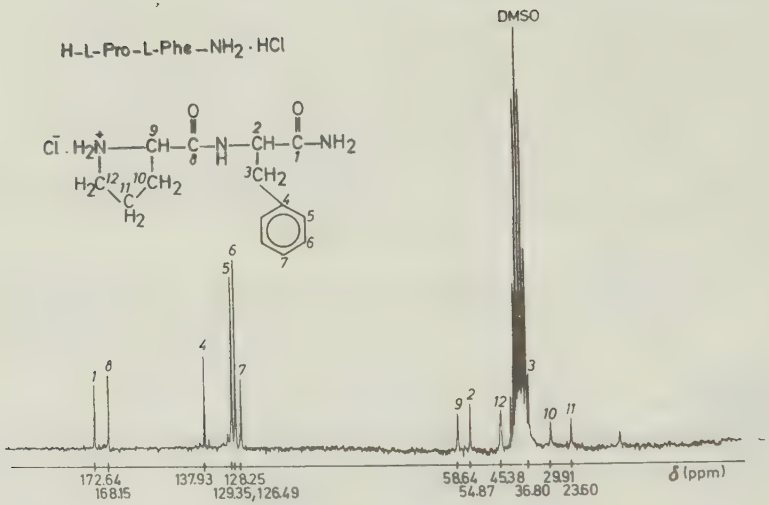


Abb. 56: ^{13}C-NMR-Spektrum von L-Pro-L-Phe-NH_2.HCl

L-Pyr-L-Pro-L-Phe-NH_2, $C_{19}H_{24}N_4O_4$/372,42

Synthese nach Strategie II

Die Ausbeute der Vorstufe Z-L-Gln(Mbh)-L-Pro-L-Phe-NH_2 beträgt bei 55 mmolarem Ansatz 19,1g (46,3% d.Th.); Fp: 176-190°; $[\alpha]_D^{25}$= -16,57° (c=1,5/AcOH).
Zur Cyclisierung mit TFA werden 1mmol (750mg) des geschützten Tripeptids eingesetzt. Die Ausbeute an chromatographisch reinem L-Pyr-L-Pro-L-Phe-NH_2 beträgt 106mg (28,5% d.Th.); Fp: ab 132° unter Zers.; $[\alpha]_D^{25}$= -29,73° (c=1,5/MeOH). Das ^{13}C-NMR-Spektrum dieser Substanz ist bereits auf Seite 12 abgebildet.

Synthese nach Strategie III

1 mmol L-Pyr-OTCP wird bei Raumtemperatur innerhalb von zwei Tagen äquimolar an L-Pro-L-Phe-NH_2.HCl gekuppelt, das mit N-Äthylmorpholin aus seinem Salz freigesetzt wird. Die Ausbeute beträgt 32,4mg (8,7% d.Th.); Fp: ab 134° unter Zers.; $[\alpha]_D^{25}$= -65,33° (c=1,5/MeOH).

Synthese nach Strategie IV

Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutamyl-L-prolyl-L-phenylalaninamid (Z-L-Pyr-L-Pro-L-Phe-NH_2), $C_{27}H_{31}N_4O_6$/507,57

Bei 5 mmolarem Ansatz liegt die Ausbeute nach Umkristallisation aus wenig MeOH/Äther bei 932mg (36,3% d.Th.); Fp: ab 54° unter Zers.; $[\alpha]_D^{25}$ = -80,0° (c=0,9/MeOH).

L-Pyr-L-Pro-L-Phe-NH_2

0,5 mmol (253,8mg) geschütztes Tripeptid werden an 30mg Palladium-Aktivkohle-Katalysator hydriert. Nach Kristallisation aus EtOH/Äther wird eine Ausbeute von 148,2mg erzielt (79,6% d.Th.); Fp: 142-147°; $[\alpha]_D^{25}$ = -63,24° (c=0,93/MeOH).

Synthese nach Strategie V

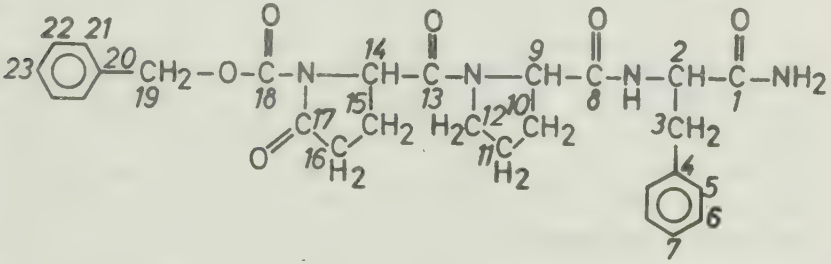
Z-L-Pyr-L-Pro-L-Phe-NH_2

13,43 mmol Z-L-Pyr werden, wie bei Z-L-Pyr-L-Phe-L-Pro-NH_2 beschrieben, mit L-Pro-L-Phe-NH_2.HCl gekuppelt. Die Ausbeute beträgt 3,7g (54,3% d.Th.); Fp: ab 57° unter Zers.; $[\alpha]_D^{25}$ = -82,5° (c=0,88/MeOH)

Elementaranalyse

ber: C = 63,89% H = 6,16% N = 11,04%

gef: C = 62,60% H = 5,98% N = 9,69%



C 1 = 172,94; C 2 = 53,74; C 3 liegt im DMSO-Signal; C 4 = 135,63; C 8 = 171,09; C 9 = 58,47; C 10 = 28,27; C 11 = 21,13; C 12 = 46,63; C 13 = 169,94; C 14 = 57,38; C 15 = 30,79; C 16 = 20,83; C 17 = 173,94; C 18 = 150,51; C 20 = 138,12; C 5, 6, 7, 21, 22, 23 = 129,38; 128,90; 128,59; 128,35; 128,17; 127,92; 126,41.

Fig. 19: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Z-L-Pyr-L-Pro-L-Phe-NH_2.

L-Pyr-L-Pro-L-Phe-NH_2

1,97 mmol (1g) des geschützten Tripeptids werden an 250mg Katalysator im Durchflußverfahren hydriert. Nach Umkristallisation aus EtOH/Äther beträgt die Ausbeute 553mg (75,7% d.Th.);
Fp: 144-151°; $[\alpha]_D^{25}$ = -66,29° (c=1,05/MeOH).
Elementaranalyse (berechnet für das Dihydrat)
ber: C = 51,34% H = 7,26% N = 12,61%
gef: C = 51,14% H = 5,56% N = 11,04%

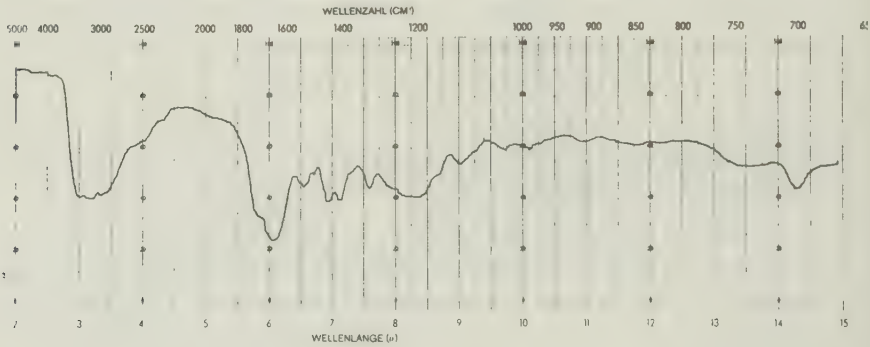


Abb. 57: IR-Spektrum von L-Pyr-L-Pro-L-Phe-NH_2;
^{13}C-NMR-Spektrum vgl. Seite 13.

Das Massenspektrum von L-Pyr-L-Pro-L-Phe-NH_2 zeigt die charakteristischen Ionen mit den Massen 84^+, 97^+, 112^+, 118^+, 162^+, 181^+, 209^+, 259^+, 287^+, 327^+, sowie das intensive Molekülion mit der Masse 372^+. Weitere Fragmente mit den Massen 68^+, 83^+, 96^+, 111^+, 180^+ und 208^+ werden in Kürze in einer Publikation ausführlich diskutiert.

5. L-Phenylalanyl-L-prolyl-L-pyroglutaminsäureamid

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-prolinmethylester (Boc-L-Phe-L-Pro-OMe), $C_{20}H_{28}N_2O_5$/376,45

150 mmol (39,8g) Boc-L-Phe werden mit äquimolaren Mengen L-Pro-OMe.HCl (24,8g), N-Äthylmorpholin (19ml), HOBt (20,2g) und DCC (34,0g) in absolutem DMF gekuppelt. Die Aufarbeitung erfolgt wie bereits beschrieben.
Ausbeute: 47,3g Öl (83,7% d.Th.); $[\alpha]_D^{25} = -37,27^\circ$ (c=2,71/AcOH).

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-prolin (Boc-L-Phe-L-Pro-OH), $C_{19}H_{26}N_2O_5$/362,42

100 mmol (37,6g) Boc-L-Phe-L-Pro-OMe werden innerhalb von zwei Stunden mit 200ml 1N KOH verseift. Nach üblicher Aufarbeitung liegt die Ausbeute bei 28,2g (78% d.Th.); Fp: ab 57° unter Zers.; $[\alpha]_D^{25} = -40,82^\circ$ (c=1,09/AcOH).
Elementaranalyse
ber: C = 62,97% H = 7,22% N = 7,73%
gef: C = 61,93% H = 7,19% N = 7,34%

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-prolyl-L-pyroglutaminsäureamid
(Boc-L-Phe-L-Pro-L-Pyr-NH_2), $C_{24}H_{32}N_4O_6$/472,54

50 mmol (18,1g) Boc-L-Phe-L-Pro-OH werden mit äquimolaren Mengen L-Pyr-NH_2 (6,41g), N-Äthylmorpholin (6,33ml), HOBt (6,76g) und DCC (10,3g) in absolutem DMF umgesetzt.
Bei der Aufarbeitung des Reaktionsansatzes zeigte sich jedoch, daß keinerlei Kupplung stattgefunden hatte.

6. L-Prolyl-L-phenylalanyl-L-pyroglutaminsäureamid

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-phenylalanylmethylester (Boc-L-Pro-L-Phe-OMe), $C_{20}H_{28}N_2O_5$/376,45

150 mmol (32,26g) Boc-L-Pro werden mit äquimolaren Mengen L-Phe-OMe.HCl (33,0g), N-Äthylmorpholin (18,97ml), HOBt (20,27g) und DCC (30,96g) in absolutem DMF gekuppelt. Nach üblicher Aufarbeitung beträgt die Ausbeute 32,5g (57,5% d.Th.); kristallisiert wird aus EtOH/Äther. Fp: 74-77°, Lit: 74-76° [91]; $[\alpha]_D^{25} = -57,86^\circ$ (c=1,4/AcOH), Lit: -53° (c=1/$CHCl_3$) [91].

Elementaranalyse

ber: C = 63,81% H = 7,50% N = 7,44%

gef: C = 63,61% H = 7,22% N = 7,37%

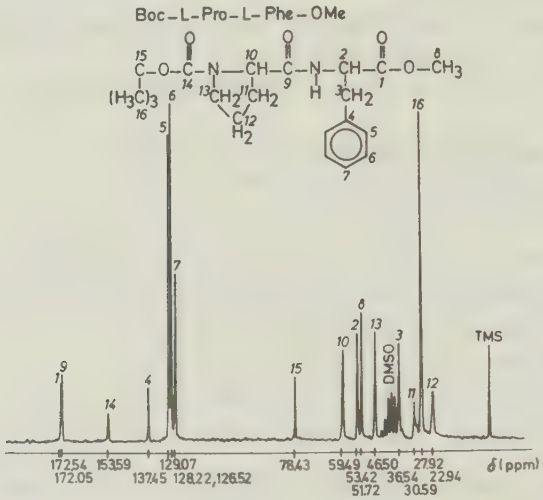


Abb. 58: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-L-Pro-L-Phe-OMe

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-phenylalanin (Boc-L-Pro-L-Phe-OH), $C_{19}H_{26}N_2O_5$/362,42

66,4 mmol (25g) Boc-L-Pro-L-Phe-OMe werden mit 67ml 1N KOH verseift. Nach üblicher Aufarbeitung kristallisiert man aus Methylenchlorid/Äther.

Ausbeute: 18,7g (77,7% d.Th); $[\alpha]_D^{25}$ = -61,76° (c=1,02/AcOH);

Fp: 143-145°.

Elementaranalyse

ber: C = 62,97% H = 7,22% N = 7,73%

gef: C = 62,73% H = 7,15% N = 7,59%

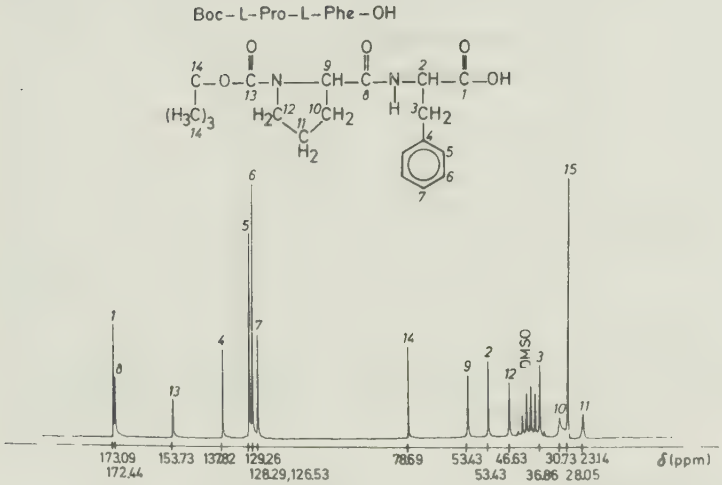


Abb. 59: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-L-Pro-L-Phe-OH

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-pyroglutaminsäureamid

(Boc-L-Pro-L-Phe-L-Pyr-NH_2), $C_{24}H_{32}N_4O_6$/472,54

50 mmol (18,1g) Boc-L-Pro-L-Phe-OH sollten mit äquimolaren Mengen L-Pyr-NH_2, N-Äthylmorpholin, HOBt und DCC gekuppelt werden. Ebenso wie bei der stellungsisomeren Verbindung Boc-L-Phe-L-Pro-L-Pyr-NH_2 fand kein Umsatz statt.

7. L-Phenylalanyl-L-pyroglutamyl-L-prolinamid

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-pyroglutaminsäureäthylester

(Boc-L-Phe-L-Pyr-OEt), $C_{21}H_{28}N_2O_6$/404,46

50 mmol (13,27g) Boc-L-Phe sollten mit äquimolaren Mengen L-Pyr-OEt (7,86g), N-Äthylmorpholin (6,33ml), HOBt (6,76g) und DCC (10,32g) unter den üblichen Bedingungen umgesetzt werden. Es bestätigte sich auch in diesem Fall, daß nach der

herkömmlichen Kupplungsmethode mittels DCC/HOBt keine Knüpfung der Peptidbindung zu erreichen ist. Diese Beobachtung wurde durch die negativen Kupplungsergebnisse bei der stellungsisomeren Verbindung Boc-L-Pro-L-Pyr-OEt erhärtet. Dort ließ sich die gewünschte Pyroglutamylsequenz ebenfalls nicht nachweisen.
Versuche, die Sequenzen L-Phe-L-Pro-L-Pyr-NH_2, L-Pro-L-Phe--L-Pyr-NH_2, L-Phe-L-Pyr-L-Pro-NH_2 und L-Pro-L-Pyr-L-Phe-NH_2 über Aktivester mit HOBt-Katalyse oder nach der 'Mixed-Anhydrid'-Methode darzustellen, schlugen gleichfalls fehl und werden nicht mehr extra beschrieben. Es wurde daher der Versuch gemacht, die Kupplung über das Säurechlorid zu erreichen. Unter gleichen Bedingungen sollte Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanylchlorid mit L-Pyroglutaminsäureäthylester oder L-Pyroglutaminsäureamid kondensiert werden; jedoch ohne Erfolg.

8. L-Phenylalanyl-L-pyroglutamyl-L-prolinamid

Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-pyroglutaminsäureäthylester (Z-L-Phe-L-Pyr-OEt), $C_{24}H_{26}N_2O_6$/438,48

24,2 mmol (7,7g) Z-L-Phe-Cl[92] werden in absolutem Benzol gelöst und mit äquimolaren Mengen L-Pyr-OEt (3,8g) und N-Äthylmorpholin (3,06ml) umgesetzt. Bereits nach kurzer Zeit fiel das Hydrochlorid des N-Äthylmorpholins aus; das gewünschte Dipeptid konnte bei der üblichen Aufarbeitung nicht nachgewiesen werden.
Analoge Ergebnisse brachte die Vergleichskupplung von Z-L-Phe-Cl mit L-Pyr-NH_2.

9. L-Prolyl-L-pyroglutamyl-L-phenylalaninamid

(Synthese über ammoniakalische oder saure Cyclisierung)

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-glutaminsäure-γ-methylester (Boc-L-Pro-L-Glu(OMe)-OH), $C_{16}H_{24}N_2O_7$/34o,37

1o mmol (3,94 g) Boc-L-Pro-OTCP werden mit 1,98 g L-Glu(OMe)-OH.HCl (äquimolar) unter Zusatz von 1,35 g (HOBt) und 1,26 ml N-Äthylmorpholin in absolutem DMF als Lösungsmittel gekuppelt. Ausbeute: 2,7 g (79,4 % d.Th.) sauberes Öl.

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-glutamyl-γ-methylester-L-phenylalaninamid

(Boc-L-Pro-L-Glu(OMe)-L-Phe-NH_2), $C_{25}H_{36}N_4O_7$/5o4,58

5,93 mmol (2,o2 g) Boc-L-Pro-L-Glu(OMe)-OH werden nach der 'Mixed-Anhydrid'-Methode mit der äquimolaren Menge L-Phe-NH_2.HCl (1,19 g) umgesetzt. Ausbeute: 2,1 g (7o,2 % d.Th.); Fp: 136-141°; $[\alpha]_D^{25}$ = -3o,82° (c=o,85/DMF).

Elementaranalyse

ber: C = 59,51 % H = 7,19 % N = 11,1o %

gef: C = 61,87 % H = 7,77 % N = 11,31 %

Zur Cyclisierung werden 5oo mg (o,99 mmol) des geschützten Tripeptids mit 2,1 ml TFA deblockiert (Dauer 1,5 h). Nach Abziehen der TFA und Trocknen im Hochvakuum nimmt man in conc. NH_3 auf, rührt für 24 h bei Raumtemperatur, engt bis zum amorph-klebrigkristallinen Rückstand ein und läßt das Produkt im Dünnschichtchromatogramm gegen das Referenzpeptid L-Pro-L-Gln-L-Phe-NH_2 laufen.

Dabei zeigte sich, daß ca.5o % des Referenzpeptids entstanden waren; der zweite intensive Fleck im Dünnschichtchromatogramm wurde als L-Pro-L-Glu(OMe)-L-Phe-NH_2 identifiziert. Die Verwendung von flüssigem Ammoniak für 1o h bei -5o°C brachte keine Änderung der Ergebnisse.

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-glutaminsäure-γ-äthylester (Boc-L-Pro-L-Glu(OEt)-OH), $C_{17}H_{28}N_2O_7$/372,42

Die Kupplung wird in $CHCl_3$ nach der 'Mixed-Anhydrid'-Methode äquimolar ausgeführt. Ansatz: 46,46 mmol (1o g) Boc-L-Pro. Ausbeute: 9,3 g (53,7 % d.Th.), Öl. $[\alpha]_D^{25}$ = -31,87° (c= 2,51/DMF).

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-glutamyl-γ-äthyl-ester-L-phenylalaninamid (Boc-L-Pro-L-Glu(OEt)-L-Phe-NH_2)

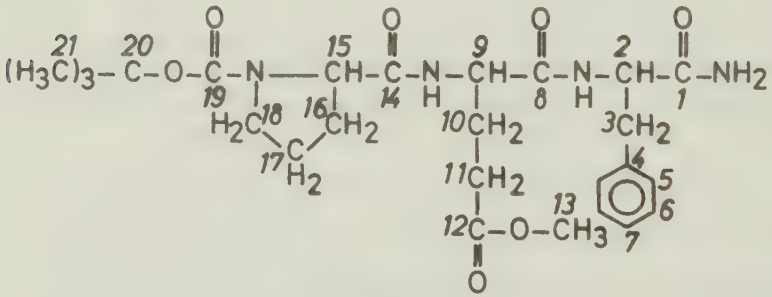
$C_{26}H_{38}N_4O_7$/518,61

Die Kupplung geschieht äquimolar nach der 'Mixed-Anhydrid'-Methode; eingesetzt werden 4,83 mmol (1,8 g) Boc-L-Pro-L-Glu(OEt)-OH. Ausbeute: 1,9 g (76 % d.Th.); Fp: 168-172°C; $[\alpha]_D^{25}$ = -31,84° (c= o,49/DMF).

Elementaranalyse

ber: C = 6o,22 % H = 7,39 % N = 1o,8o %

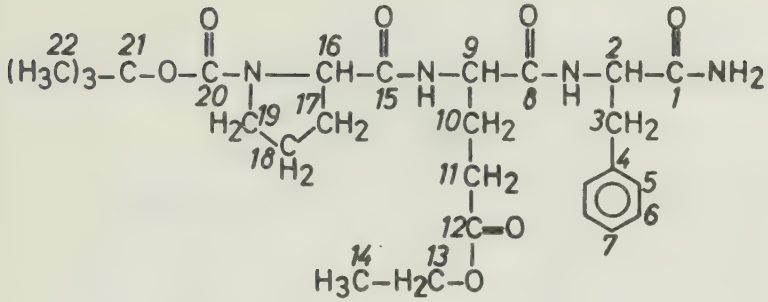
gef: C = 59,o5 % H = 7,65 % N = 1o,91 %



C 1 = 17o,79; C 2 = 53,61; C 3 = 38,19; C 4 = 137,88;
C 5 = 129,26; C 6 =128,11; C 7 =126,29; C 8 = 172,79;
C 9 = 51,31; C1o = 27,63; C11 = 3o,67; C12 = 172,61;
C13 = 56,o4; C14 =173,64; C15 = 59,32; C16 = 29,69;
C17 = 24,54; C18 = 46,63; C19 =156,22; C2o = 78,63;
C21 = 28,o5.

Fig. 2o: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Boc-L-Pro-L-Glu(OMe)-L-Phe-NH_2.

Zur Cyclisierung werden 1,16 mmol (6oo mg) des Äthylesters wie bereits beschrieben, behandelt. Im vorliegenden Fall entstand quantitativ das Glutaminpeptid.



C 1 = 173,4o; C 2 = 51,43; C 3 = 37,78; C 4 = 138,25;
C 5 = 129,38; C 6 =128,29; C 7 =126,47; C 8 = 172,43;
C 9 = 54,16; C1o = 27,57; C11 = 3o,12; C12 = 173,15;
C13 = 6o,17; C14 = 14,21; C15 =17o,19; C16 = 59,2o;
C17 = 27,81; C18 = 23,71; C19 = 46,81; C2o = 154,o3;
C21 = 78,93; C22 = 28,18.

Fig. 21: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Boc-L-Pro-L-Glu(OEt)-L-Phe-NH_2.

Synthese des Referenzpeptids L-Prolyl-L-glutaminyl-L-phenylalaninamid

Benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-phenylalaninamid (Z-L-Gln-L-Phe-NH_2), $C_{22}H_{26}N_4O_5$/426,47

Die Kupplung erfolgt nach der DCC/HOBt-Methode in absolutem DMF. Ansatz: 3o mmol; alle Reaktionskomponenten äquimolar. Die Ausbeute beträgt nach Fällen aus DMF/H_2O 7,9 g (61,7 % d.Th.) Fp: 232-234°; $[\alpha]_D^{25}$ = -11,77° (c=1,o1/AcOH).

Elementaranalyse

ber: C = 61,96 % H = 6,14 % N = 13,14 %
gef: C = 61,o3 % H = 6,oo % N = 12,77 %

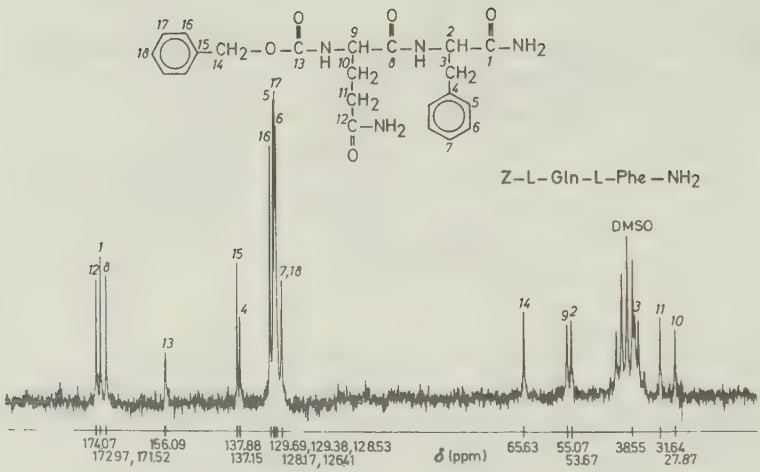


Abb. 6o: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-L-Gln-L-Phe-NH_2.

L-Glutaminyl-L-phenylalaninamid(Hydrochlorid)
(L-Gln-L-Phe-NH_2.HCl), $C_{14}H_{21}N_4O_3Cl/328,8o$

4,7 mmol (2 g) Z-L-Gln-L-Phe.NH_2 werden wie üblich in Methanol/Wasser hydriert. Ausbeute: 1,5 g (quantitativ); Fp: = ab 88° unter Zers. $[\alpha]_D^{25}$ = + 1o,56° (c= 1,6/DMF).

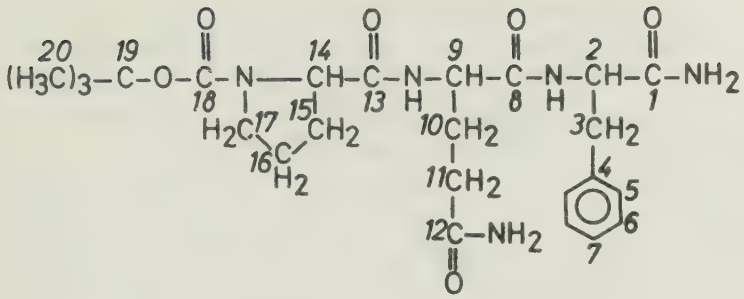
Elementaranalyse

ber: C = 51,14 % H = 6,44 % N = 17,o4 % Cl = 1o,78 %

gef: C = 47,3o % H = 6,1o % N = 15,27 % Cl = 1o,73 %

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-glutaminyl-L-phenylalaninamid (Boc-L-Pro-L-Gln-L-Phe-NH_2) $C_{24}H_{35}N_5O_6/489,57$

Zur Kupplung nach der 'Mixed-Anhydrid'-Methode in $CHCl_3$ und wenig THF werden jeweils 3,53 mmol der Reaktionspartner eingesetzt. Nach Kristallisation aus Methanol/Äther beträgt die Ausbeute: 1,2 g (69,3 % d.Th.); Fp: ab 144° unter Zers. $[\alpha]_D^{25}$ = - 19,32° (c = 1,o3/DMF).



C 1 = 172,97; C 2 = 52,71; C 3 = 37,oo; C 4 = 137,94;
C 5 = 129,2o; C 6 =128,11; C 7 =126,11; C 8 = 172,67;
C 9 = 53,74; C1o = liegt unter Methylsignal der Boc-Gruppe; C 11 = 31,52; C 12 = 174,19; C 13 = 171,15;
C 14 = 59,57; C 15 = 29,82; C 16 = 23,2o; C 17 = 46,7o;
C 18 =154,37; C 19 = 78,69; C 2o = 28,12.

Fig.22: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Boc-L-Pro-L-Gln-L-Phe-NH_2.

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-glutaminsäure-γ-benzylester (Boc-L-Pro-L-Glu(OBzl)-OH), $C_{22}H_{3o}N_2O_7$/434,49

Die Kupplung nach der Aktivester-Methode unter Zusatz von HOBt wird äquimolar mit 6,33 mmol (2,5 g) Boc-L-Pro-OTCP in absolutem DMF als Lösungsmittel durchgeführt.
Ausbeute: 2,3 g (an nicht vollständig sauberem Öl);
(83 % d.Th.); $[\alpha]_D^{25}$ = -17,3° (c=5,49/DMF).

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-glutamyl-γ-benzylester-L-phenylalaninamid (Boc-L-Pro-L-Glu(OBzl)-L-Phe-NH_2)
$C_{31}H_{4o}N_4O_7$/58o,68

Gekuppelt werden äquimolare Mengen (12,43 mmol) in Chloroform nach der 'Mixed-Anhydrid'-Methode. Die Kristallisation aus $CHCl_3$/Äther liefert das Produkt in 63,7 % (4,6 g) Ausbeute.
Fp: 162-164°; $[\alpha]_D^{25}$ = -35,7° (c=1/DMF).

Elementaranalyse
ber: C = 64,12 % H = 6,94 % N = 9,65 %
gef: C = 63,35 % H = 6,82 % N = 9,1o %

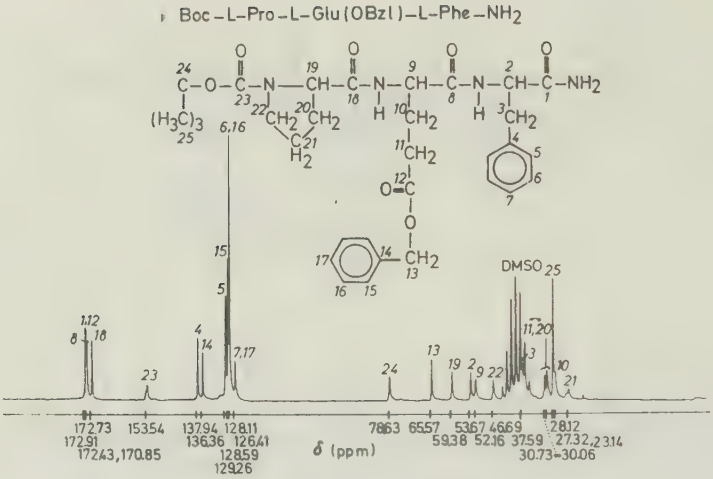


Abb. 61: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-L-Pro-L-Glu(OBzl)-L-Phe-NH_2.

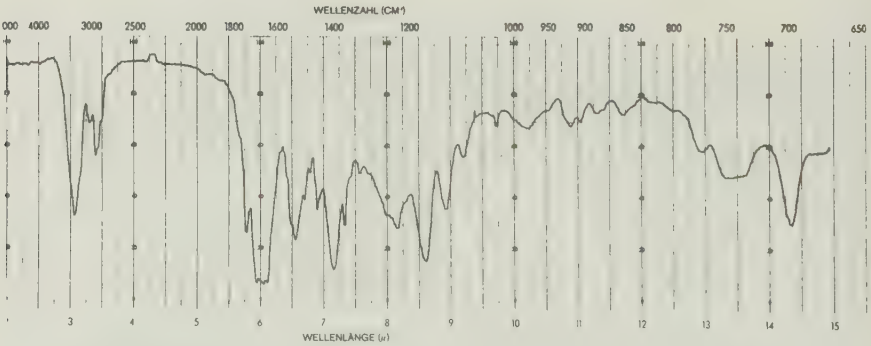


Abb. 62: IR-Spektrum von Boc-L-Pro-L-Glu(OBzl)-L-Phe-NH_2.

Zur Cyclisierung behandelt man entweder o,68 mmol (4oo mg) des geschützten Tripeptids mit ca. 2o ml flüssigem HF für 2 h bei Raumtemperatur, oder o,17 mmol(1oo mg) mit 15 ml TFA für 3 h unter Rückfluß. Nach Aufarbeitung beider Reaktionsansätze und Trennung durch Mitteldruckchromatographie ließen sich die gesuchten Pyroglutamylpeptide nicht nachweisen.

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-(4,4'-dimethoxybenzhydryl)-L-glutaminylmethylester(Boc-L-Pro-L-Gln(Mbh)-OMe)

$C_{31}H_{41}N_3O_8$/538,68

Zur Kupplung wird das DCC/HOBt-Verfahren angewendet. Ansatz: 14,2 mmol (3,o6 g) Boc-L-Pro; die restlichen Reaktionsteilnehmer werden äquimolar zugegeben. Nach Abtrennen des Dicyclohexylharnstoffs wird mit Wasser aus DMF gefällt. Ausbeute: 7,2 g Öl (94 % d.Th.); $[\alpha]_D^{25} = -24,o^\circ$ (c=o,95/DMF).

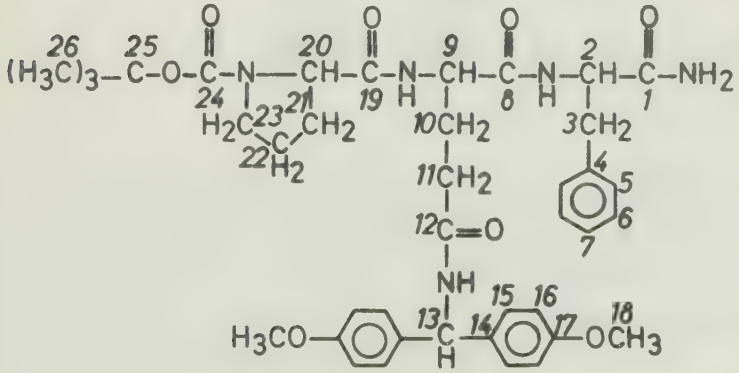
Die Verseifung des Öls zur freien Dipeptidsäure wird nur dünnschichtchromatographisch kontrolliert.

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-(4,4'-dimethoxybenzhydryl)-L-glutaminyl-L-phenylalaninamid (Boc-L-Pro-L-Gln(Mbh)-L-Phe-NH_2)

$C_{39}H_{49}N_5O_8$/715,85

Zur DCC/HOBt-Kupplung in absolutem DMF werden 6,36 g Boc-L-Pro-L-Gln(Mbh)-OH eingesetzt. Die übrigen Komponenten werden äquimolar zugegeben.

Das Produkt läßt sich mit einer Ausbeute von 5,7g (71,3 % d.Th.) aus DMF fällen. Fp: ab 142° unter Zers.; $[\alpha]_D^{25} = -21,5^\circ$ (c=1/DMF).



C 1 = 172,73; C 2 = 51,o6; C 3 = 37,66; C 4 = 137,88;
C 5 = 129,26; C 6 =128,17; C 7 =126,35; C 8 = 171,15(171,o3)

C 9 = 53,5o; C 1o = liegt unter Methylsignal der Boc-Gruppe; C 11 = 32,36; C 12 = 171,15 (171,o3); C 13 = 47,67; C 14 = 135,21; C 15 = 128,41; C 16 = 113,84; C 17 =158,28; C 18 = 55,19; C 19 = 171,15 (171,o3); C 2o = 59,69; C 21 = 29,7o; C 22 = 24,47; C 23 = 46,58; C 24 = 154,o4; C 25 = 78,75; C 26 = 28,12.

Fig. 23: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Boc-L-Pro-L-Gln(Mbh)-L-Phe-NH_2.

Zur Cyclisierung behandelt man o,5 mmol (35o mg) des geschützten Peptids entweder in 2o ml flüssigem HF oder 45 ml TFA unter Rückfluß. In beiden Fällen ließ sich das Pyroglutamylpeptid nach der Aufarbeitung nicht nachweisen.

1o. L-Phenylalanyl-L-Pyroglutamyl-L-Prolinamid

Die entsprechenden Stellungsisomere mit carboxylendständigem Prolin werden völlig analog dargestellt. Sie werden deshalb nur in der Symbolschreibweise mit knapper Angabe der physikalischen und spektroskopischen Daten aufgeführt.

Boc-L-Phe-L-Glu(OMe)-OH ($C_{2o}H_{28}N_2O_7$/4o8,45)
Ansatz: 1o mmol; Ausbeute: 3,1 g (76 % d.Th.) Öl
$[\alpha]_D^{25}$ = -4,8° (c= 1,73/DMF)

Boc-L-Phe-L-Glu(OMe)-L-Pro-NH_2 ($C_{25}H_{36}N_4O_7$/5o4,58)
Ansatz: 6,o7 mmol; Ausbeute: 2,4 g (78,4 % d.Th.) Öl
$[\alpha]_D^{25}$ = -5,1° (c=1,o/DMF).

Zur Cyclisierung wurden 6oo mg (1,2 mmol) des geschützten Tripeptids eingesetzt. Auch in diesem Fall wurden nur die Verbindungen L-Phe-L-Glu(OMe)-L-Pro-NH_2 und L-Phe-L-Gln-L-Pro-NH_2 nachgewiesen.

Boc-L-Phe-L-Glu(OEt)-OH ($C_{11}H_{3o}N_2O_7$/422,48)

Ansatz: 37,69 mmol; Ausbeute: 116 g (72,8 % d.Th.) Öl
$[\alpha]_D^{25}$ = -12,16° (c=o,97/DMF)

Boc-L-Phe-L-Glu(OEt)-L-Pro-NH_2 ($C_{26}H_{38}N_4O_7$/518,61)

Ansatz: 14,68 mmol; Ausbeute: 5,3 g (69 % d.Th.) an klebrig-wachsartigem Produkt; $[\alpha]_D^{25}$ = -2o,o° (c=1,o7/DMF)

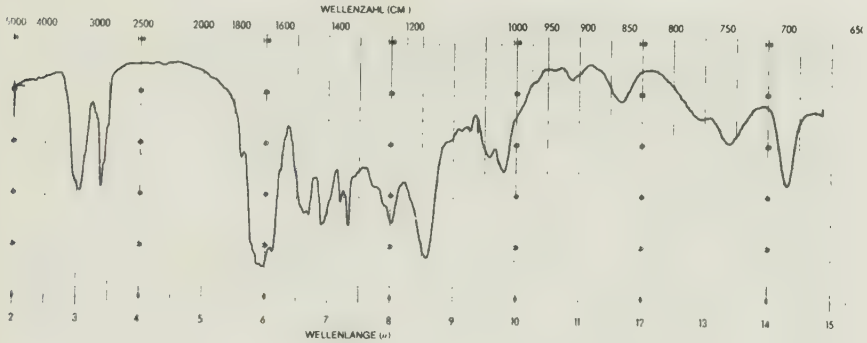
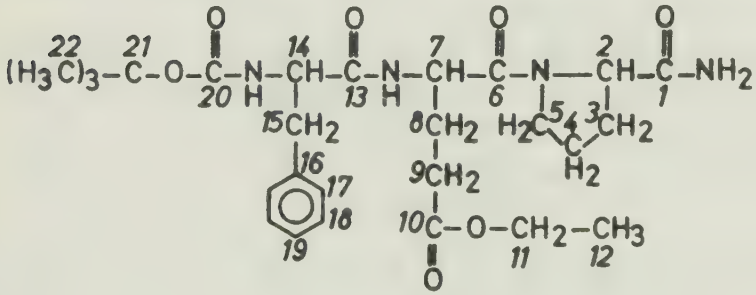


Abb. 63: IR-Spektrum von Boc-L-Phe-L-Glu(OEt)-L-Pro-NH_2.



C 1 = 173,7o; C 2 = 59,68; C 3 = 27,38; C 4 = 24,4o;
C 5 = 46,69; C 6 =171,64; C 7 = 55,9o; C 8 = 26,39;
C 9 = 31,o3; C1o =172,24; C11 = 59,93; C12 = 14,o3;
C13 = 17o,54; C 14 = 53,63; C 15 = 37,33; C 16 = 138,25;
C 17 = 129,38; C 18 = 128,17; C 19 = 126,35; C 2o = 155,37; C 21 = 78,14; C 22 = 28,12.

Fig. 24: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Boc-L-Phe-L-Glu(OEt)-L-Pro-NH_2.

Zur Cyclisierung wurden ebenfalls 1,16 mmol (6oo mg) geschütztes Tripeptid eingesetzt. Wie beim Stellungsisomeren ließ sich nur das entsprechende Glutaminderivat nachweisen.

Synthese der Referenzsequenz L-Phe-L-Gln-L-Pro-NH_2

Z-L-Gln-L-Pro-NH_2 ($C_{18}H_{24}N_4O_5$/376,51)

Ansatz: 3o mmol; Ausbeute: 8,6 g (76 % d.Th.)
Fp: 231-235° $[\alpha]_D^{25}$ = -12,o1° (c=1,oo/AcOH)

Elementaranalyse
ber: C = 57,44 % H = 6,43 % N = 14,88 %
gef: C = 6o,97 % H = 6,o7 % N = 12,73 %

L-Gln-L-Pro-NH_2.HCl ($C_{1o}H_{29}N_4O_3$/278,74)

Ansatz: 8 mmol; Ausbeute: quantitativ
Fp: ab 62° unter Zers. $[\alpha]_D^{25}$ = + 9,21°(c=o,76/DMF)

Boc-L-Phe-L-Gln-L-Pro-NH_2 ($C_{24}H_{35}N_5O_6$/489,57)

Ansatz: 4,7 mmol; Ausbeute: 1,6 g (69,5 % d.Th.);
Fp: ab 163° unter Zers.; $[\alpha]_D^{25}$ = -14,4 (c=o,97/DMF)

Elementaranalyse
ber: C = 58,88 % H = 7,21 % N = 14,31 %
gef: C = 6o,o6 % H = 7,9o % N = 11,4o %

Boc-L-Phe-L-Glu(OBzl)-OH ($C_{26}H_{32}N_2O_7$/484,55)

Ansatz: 28,3 mmol; Ausbeute: 9,2 g (67,1 % d.Th.) Öl.

Boc-L-Phe-L-Glu(OBzl)-L-Pro-NH_2 ($C_{31}H_{4o}N_3O_7$/566,67)

Ansatz: 2o,6 mmol; Ausbeute: 6,3 (53,9 % d.Th.); Fp: 57-61°;
$[\alpha]_D^{25}$ = -15,29° (c=1,o4/DMF).

Elementaranalyse
ber: C = 65,71 % H = 7,11 % N = 7,42 %
gef: C = 63,oo % H = 7,12 % N = 8,66 %

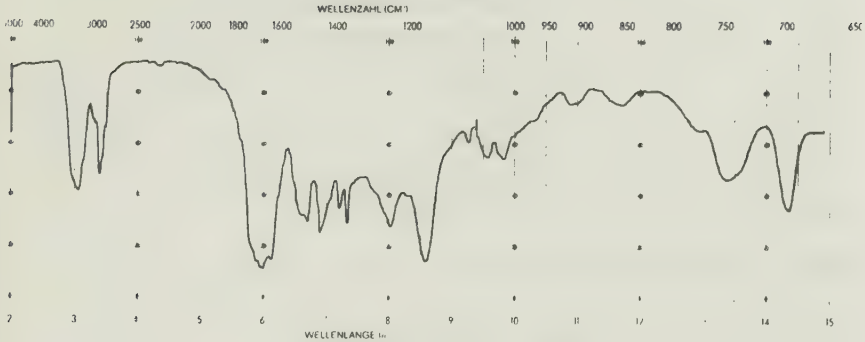
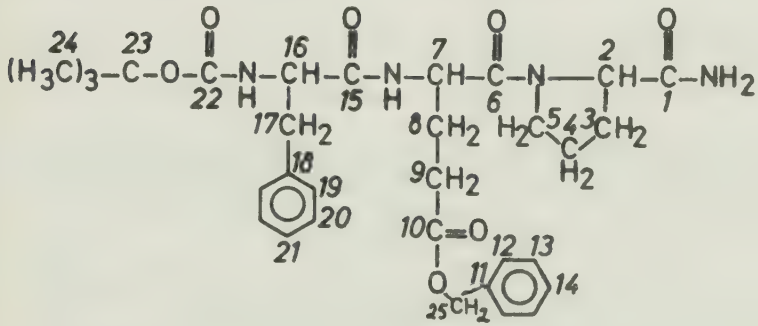


Abb. 64: IR-Spektrum von Boc-L-Phe-L-Glu(OBzl)-L-Pro-NH_2.



C 1 = 173,76; C 2 = 59,81; C 3 = 3o,24; C 4 = 24,59;
C 5 = 46,75; C 6 =172,43; C 7 = 56,16; C 8 = 29,94;
C 9 = 3o,73; C1o =174,o7; C11 = 138,37; C15 = 169,51;
C16 = 51,25; C17 = Signal liegt im DMSO-Peak; C18 =
136,36; C 22 = 155,43; C 23 = 78,26; C 24 = 28,18;
C 12,13,14,19,2o, 21 = 129,44; 128,9o; 128,59; 128,17;
126,35; C 25 = 65,73.

Fig. 25: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Boc-L-Phe-L-Glu(OBzl)-L-Pro-NH_2.

Zur Cyclisierung behandelt man jeweils 35o mg (o,62 mmol) des geschützten Peptids mit 2o ml flüssigem HF oder 45 ml kochender TFA.

Aus beiden Reaktionsansätzen ließ sich das gewünschte Produkt mit Hilfe der Mitteldruckchromatographie isolieren. Siehe Abb. 18-21 im allgemeinen Teil; der mit x gekennzeichnete 'Peak' entspricht dem Pyroglutamylpeptid.

Ausbeute der HF-Cyclisierung: 3,8 mg (1,65 % d.Th.)
Bei 8 % Ausbeuteverlust (Teilerverhältnis) liegt die Ausbeute bei 4,1 mg (1,78 % d.Th.).

Ausbeute der TFA-Cyclisierung: 2,3 mg (1 % d.Th.).

Boc-L-Phe-L-Gln(Mbh)-OMe ($C_{35}H_{43}N_3O_8$/633,74)
Ansatz: 14,2 mmol; Ausbeute 6,4 g (71,1 % d.Th.)
Fp: 119-123°; $[\alpha]_D^{25}$ = -5,34° (c=1,o3/DMF).

Boc-L-Phe-L-Gln(Mbh)-L-Pro-NH_2 ($C_{39}H_{49}N_5O_8$/715,85)
Ansatz: 8,28 mmol; Ausbeute: 3,8 g (64 % d.Th.)
Fp: ab 181° unter Zers.; $[\alpha]_D^{25}$ = -22,o5°(c=1,o2/DMF).

Zur Cyclisierung wurden 8oo mg des geschützten Peptids für 2,5 h in flüssigem HF gerührt. Das Pyroglutamylpeptid ließ sich chromatographisch nicht nachweisen. Das Ergebnis wurde durch den Parallelversuch mit TFA bestätigt.

11. L-Prolyl-L-phenylalanyl-L-pyroglutaminsäureamid

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-glutaminsäuredimethylester ($C_{26}H_{37}N_3O_8$/519,59)

(Boc-L-Pro-L-Phe-L-Glu(OMe)OMe)

8mmol (2,9 g) Boc-L-Pro-L-Phe-OH kuppelt man mit DCC/HOBt in absolutem DMF äquimolar mit L-Glu(OMe)-OMe.HCl. Die Kristallisation erfolgt aus reinem Äther.
Ausbeute: 2,9 g (69,7% d.Th.); Fp = 98-99°; $[\alpha]_D^{25}$ = -51,8° (c=o,96/DMF);
Elementaranalyse
ber: C = 6o,1o % H = 7,18 % N = 8,o9 %
gef: C = 61,3o % H = 7,6o % N = 7,65 %

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-glutaminsäurediäthylester (Boc-L-Pro-L-Phe-L-Glu(OEt)-OEt)

($C_{28}H_{41}N_3O_8$/547,64)

Ansatz und Bedingungen entsprechen dem oben beschriebenen Dimethylester. Ausbeute: 3,5 g (79,9 % d.Th.); Fp: 94-97°; $[\alpha]_D^{25}$ = -49,47 (c=1/DMF).

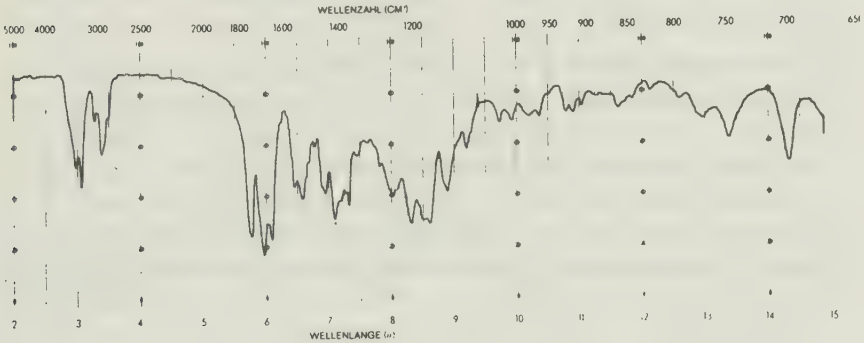
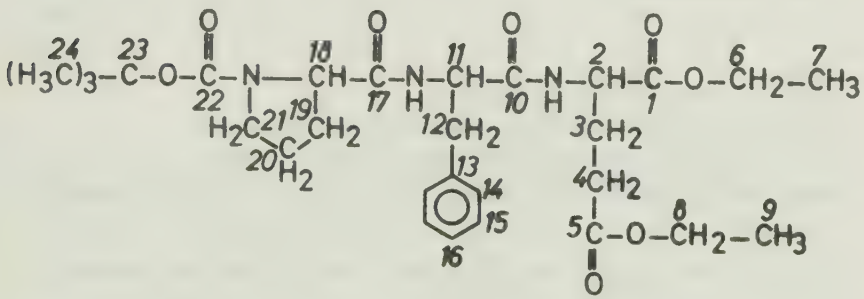


Abb. 65: IR-Spektrum von Boc-L-Pro-L-Phe-L-Glu(OEt)-OEt.



C 1 = 172,37; C 2 = 53,67; C 3 = 26,29; C 4 = 3o,55;
C 5 = 172,37; C 6 = 6o,66; C 7 = 14,o3; C 8 = 6o,66;
C 9 = 14,o3; C1o =172,18; C11 = 51,31; C12 = 37,59;
C13 = 137,88; C14 =129,26; C15 =128,o5; C16 =126,35;
C17 = 171,45; C18 = 59,99; C19 = 27,99; C2o = 23,o2;
C21 = 46,63; C22 =153,67; C23 = 78,51; C24 = 27,99.

Fig. 26: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Boc-L-Pro-L-Phe-L-Glu(OEt)-OEt.

Elementaranalyse
ber: C = 61,41 % H = 7,55 % N = 7,67 %
gef: C = 6o,46 % H = 7,24 % N = 8,2o %.

Zur Cyclisierung wurde o,96 mmol (5oo mg) Dimethylester oder (1,48 mmol) 81o mg Diäthylester in 2,o4 ml (3,14 ml) TFA deblockiert, nach Abziehen der TFA im Hochvakuum getrocknet und anschließend für 24 h bei Raumtemperatur in 8 ml (12 ml) NH_3 (conc.) gerührt.

Die chromatographische Untersuchung der Reaktionsansätze ergab folgendes Bild: Während der Diäthylester nahezu quantitativ in das entsprechende Diamid überging, wurden beim Dimethylester neben beträchtlicher Mengen der Ausgangsverbindung noch das Diamid L-Pro-L-Phe-L-Gln-NH_2 und das Ester-Amid L-Pro-L-Phe-L-Gln-OMe nachgewiesen. Ein drittes mögliches Nebenprodukt, L-Pro-L-Phe-L-Isogln-OMe wurde nicht gefunden.

Der Versuch wurde mit gleichen Mengen auch für 1o h in flüssigem Ammoniak bei -4o° durchgeführt. Dies führte nicht zu anderen Ergebnissen.

Synthese der Referenzpeptide
L-Prolyl-L-phenylalanyl-L-isoglutaminmethylester
N-tert-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-isoglutaminmethylester (Boc-L-Pro-L-Phe-L-Isogln-OMe), $C_{25}H_{36}N_4O_7$/5o4,58

2,54 mmol (o,92 g) Boc-L-Pro-L-Phe-OH werden nach der DCC/HOBt-Methode in DMF äquimolar mit L-Isogln-OMe.HCl gekuppelt. Kristallisiert wird aus MeOH/Äther mit einer Ausbeute von 96o mg (75 % d.Th.); Fp: 141-146°; $[\alpha]_D^{25}$ = -33,o2° (c= o,97/ DMF).
Elementaranalyse
ber: C = 59,51 % H = 7,19 % N = 11,1o %
gef: C = 58,86 % H = 7,o4 % N = 11,34

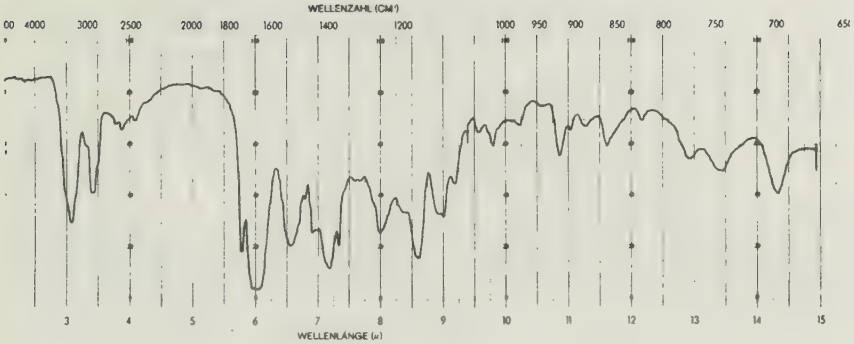
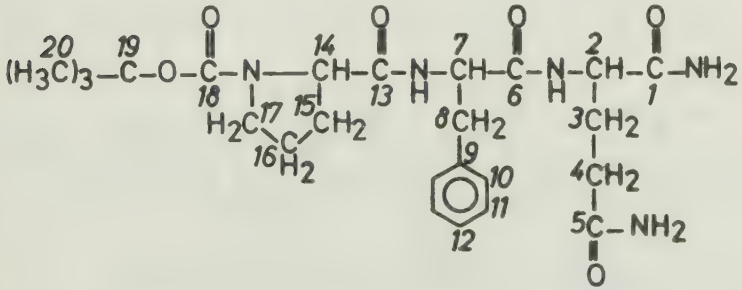


Abb. 66: IR-Spektrum von Boc-L-Pro-L-Phe-L-Isogln-OMe.

L-Prolyl-L-phenylalanyl-L-glutaminamid

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-glutaminamid (Boc-L-Pro-L-Phe-L-Gln-NH_2) $C_{24}H_{35}N_5O_6$/489,57

Mit DCC/HOBt in absolutem DMF werden 2,75 mmol Boc-L-Pro-L-Phe-OH äquimolar an L-Gln-NH_2.HCl kondensiert. Nach Abtrennen des Dicyclohexylharnstoffs wird das Peptid mit Äther gefällt und aus MeOH/Äther umkristallisiert.
Ausbeute: 1,1 g (81,5 % d.Th.); Fp: ab 172° unter Zers.;
$[\alpha]_D^{25} = -13,9^\circ$ (c=o,97/DMF).



C 1 = 173,22; C 2 = 54,29; C 3 = liegt unter Methylsignal der Boc-Gruppe; C 4 = 31,52; C 5 = 173,88; C 6 = 172,49;

C 7 = 52,28; C 8 = liegt im DMSO-Peak; C 9 = 137,94; C 1o = 129,26; C 11 = 128,11; C 12 = 126,29; C 13 = 171,o9; C 14 = 59,63; C 15 = 31,51; C 16 = 23,2o; C 17 = 46,64; C 18 = 153,61; C 19 = 78,63; C 2o = 28,o5;

Fig. 27: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Boc-L-Pro-L-Phe-L-Gln-NH_2.

L-Prolyl-L-phenylalanyl-L-glutaminmethylester
N-tert-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-glutaminmethylester (Boc-L-Pro-L-Phe-L-Gln-OMe), $C_{25}H_{36}N_4O_7$/5o4,58

Gekuppelt wird äquimolar in $CHCl_3$ mit Hilfe der 'Mixed-Anhydrid'-Methode. Ansatz: 5,5 mmol (2 g) Boc-L-Pro-L-Phe-OH. Ausbeute: 1,8 g (64,7 % d.Th.); Fp: 91-93°; $[\alpha]_D^{25}$ = -38,58° (c=o,99/DMF).

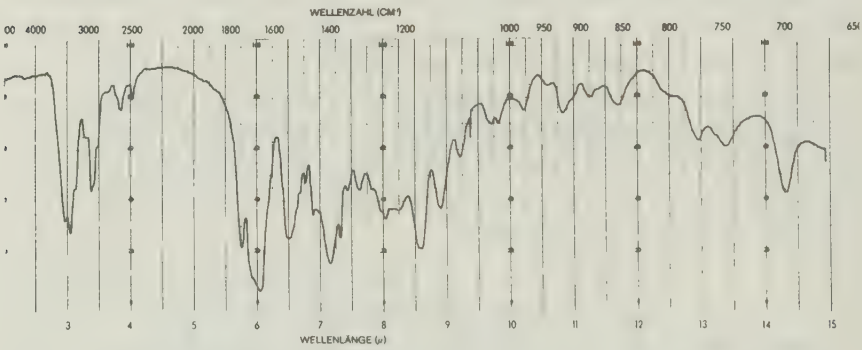


Abb. 67: IR-Spektrum von Boc-L-Pro-L-Phe-L-Gln-OMe.

Zum chromatographischen Vergleich spaltet man mit TFA die Boc-Gruppe ab und neutralisiert mit conc.NH_3.

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-isoglutaminmethylester

Die Synthese wurde bereits bei den Referenzpeptiden beschrieben.
Der Versuch, die Verbindung durch verlängerte Reaktionszeit (3 Tage) in conc. NH_3 ins gewünschte Pyroglutamylpeptid zu überführen, lieferte ebenfalls nur das Diamid.

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-isoglutaminbenzylester (Boc-L-Pro-L-Phe-L-Isogln-OBzl), $C_{31}H_{4o}N_4O_7$/589,68

2,6 mmol (o,94 g) Boc-L-Pro-L-Phe-OH werden mit der DCC/HOBt-Methode in DMF äquimolar an L-Isogln-OBzl gekuppelt. Kristallisiert wird aus MeOH/Äther mit einer Ausbeute von 1,3 g (86,1 % d.Th.); Fp: 158-162°; $[\alpha]_D^{25} = -57,17^o$ (c=1,2/DMF).

Elementaranalyse

ber: C = 64,12 % H = 6,54 % N = 9,65 %

gef: C = 63,27 % H = 7,12 % N = 9,9o %.

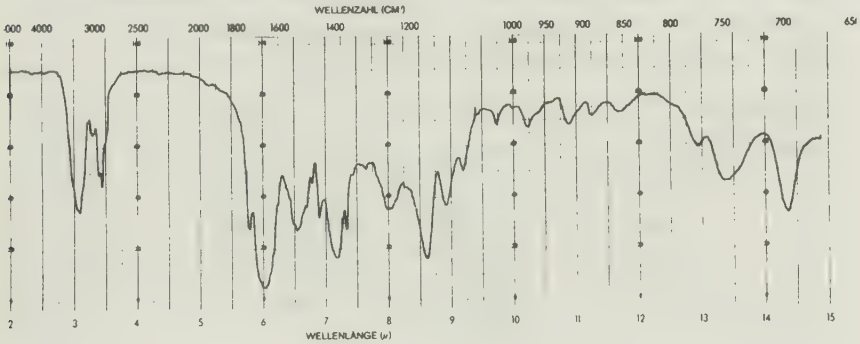
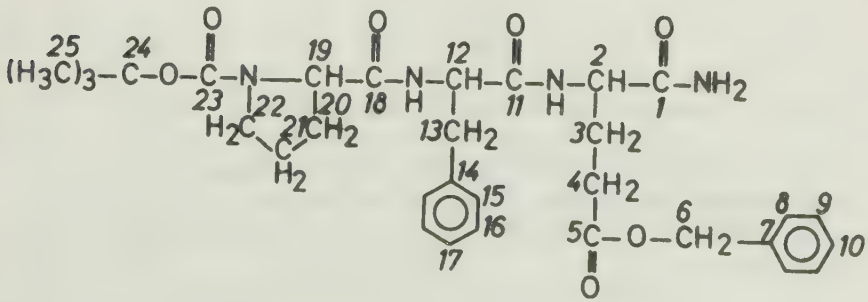


Abb. 68: IR-Spektrum von Boc-L-Pro-L-Phe-L-Isogln-OBzl.



C 1 = 172,91; C 2 = 54,22; C 3 = 23,26; C 4 = 31,o9;

C 5 = 173,28; C 6 = 65,7o; C 7 = 138,o6; C 11 = 172,61; C 14 = 137,88; C 18 = 171,27; C 19 = 6o,11; C 2o = liegt unter Methylsignal der Boc-Gruppe; C 21 = 24,65; C 22 = 46,75; C 23 = 154,7o; C 24 = 28,93; C 25 = 28,o5; C 8,9,1o,15,16,17 = 129,32; 128,59; 128,17; 126,77; 126,47; C 12 = 51,79; C 13 = 37,83.

Fig. 28: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Boc-L-Pro-L-Phe-L-Isogln-OBzl.

Zur Cyclisierung wurden jeweils o,43 mmol (25o mg) Tripeptid in 35 ml TFA unter Rückfluß bzw. in 25 ml flüssigem HF bei Raumtemperatur umgesetzt.

Nach der Aufarbeitung ließ sich mit Hilfe der Mitteldruckchromatographie aus beiden Cyclisierungsansätzen das gewünschte Pyroglutamylpeptid isolieren und nachweisen.

Ausbeute der HF-Cyclisierung: 2,7 mg (1,69 % d.Th.)

Ausbeute der TFA-Cyclisierung: 3,4 mg (2,13 % d.Th.).

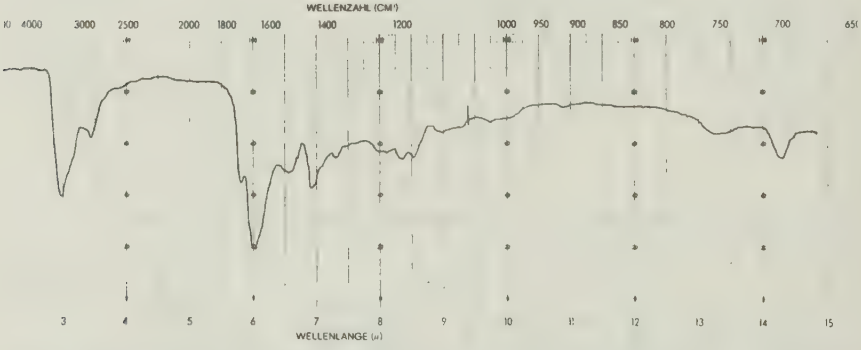


Abb. 69: IR-Spektrum von L-Pro-L-Phe-L-Pyr-NH_2.

Im Massenspektrum findet man für beide Reaktionsansätze die charakteristischen Ionen mit den Massen 98^+, 127^+, 146^+, 244^+, 273^+. Außerdem findet man das Molekülion mit der Masse 372^+.

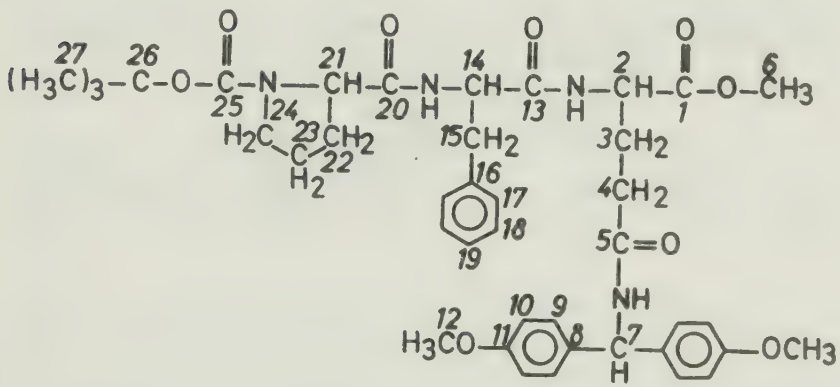
Als eines der Nebenprodukte der Cyclisierungsreaktion wurde L-Pro-L-Phe-L-Isogln-OH eindeutig identifiziert. Zum chromatographischen Vergleich wurde die Verbindung aus Boc-L-Pro-L-Phe-L-Isogln-OBzl durch Abspalten der Boc-Gruppe und anschließende Verseifung dargestellt.

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-(4,4'-dimethoxybenzhydryl)-L-glutaminmethylester

(Boc-L-Pro-L-Phe-L-Gln(Mbh)-OMe) $C_{4o}H_{5o}N_4O_9$/73o,86

3 mmol Boc-L-Pro-L-Phe-OH (1,o9 g) werden in DMF (abs.) äquimolar mit L-Gln(Mbh)-OMe.HCl nach der DCC/HOBt-Methode gekuppelt.

Ausbeute: 1,6 g (73 % d.Th.); Fp: ab 68° unter Zers.; $[\alpha]_D^{25}$ = -17,92° (c= 1,o1/DMF).



C 1 = 172,37; C 2 = 54,83; C 3 = 27,o5; C 4 = 31,76; C 5 = 172,37; C 6 = 51,91; C 7 = 47,61; C 8 =135,o9; C1O = 113,84; C11 =158,28; C12 = 55,19; C13 =172,oo; C14 = 53,58; C15 = liegt im DMSO-Peak; C 2o=17o,54; C 21= 59,44; C 22=29,O9; C 23=24,59; C 24=46,88; C 25= 155,83; C 26= 78,14; C 27= 28,24; C 9;17;18;19 = 129,5O; 128,41; 128,17.

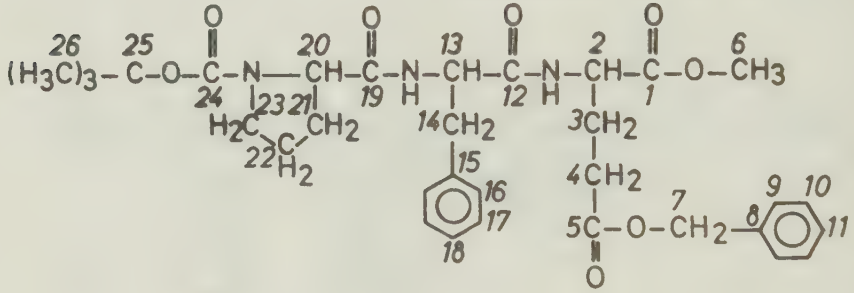
Fig. 29: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Boc-L-Pro-L-Phe-L-Gln (Mbh)-OMe.

Zur Cyclisierung wurden 35Omg Tripeptid für 3 h mit HF

umgesetzt, aufgearbeitet und für 24 h mit conc. NH_3 gerührt. Die chromatographsiche Untersuchung des Reaktionsansatzes zeigte, daß das Pyroglutamylpeptid nicht entstanden war. Interessanterweise konnten zwei Nebenprodukte als L-Pro-L-Phe-L-Gln-NH_2 und L-Pro-L-Phe-L-Gln-OMe identifiziert werden. (Siehe Diskussion im allgemeinen Teil).

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-glutaminsäure-γ-benzylester-α-methylester
(Boc-L-Pro-L-Phe-L-Glu(OBzl)-OMe), $C_{32}H_{41}N_3O_8$/595,69

3,28 mmol Boc-L-Pro-L-Phe-OH werden in $CHCl_3$/THF äquimolar mit L-Glu(OBzl)-OMe.TFA nach der 'Mixed-Anhydrid'-Methode umgesetzt. Ausbeute: 1,1 g (56,4 % d.Th.).



C 1 = 172,12; C 2 = 53,67; C 3 = 26,o6; C 4 = 3o,9o;
C 5 = 172,12; C 6 = 51,25; C 7 = 65,63; C 8 =138,46;
C 12 = 171,94; C 13 = 51,97; C 14 = 37,33; C 15 = 137,66;
C 19 = 171,28; C 2o = 59,62; C 21 = 23,2o; C 22 = 3o,oo;
C 23 = 46,61; C 24 = 153,91; C 25 = 78,44; C 26 = 28,o5;
C 9,1o,11,16,17,18 = 129,26; 128,53; 128,11; 126,35.

Fig. 3o: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Boc-L-Pro-L-Phe-L-Glu(OBzl)-OMe.

Jeweils 275 mg des Tripeptiddiesters wurden zunächst mit 35 ml TFA bzw. 25 ml flüssigem HF behandelt; darauf mit NH_3 conc. Nach Aufarbeitung beider Ansätze wurde L-Pro-L-Phe-L-Isogln-OH als Hauptreaktionsprodukt erkannt. Bei einem zweiten Nebenprodukt handelt es sich mit Sicherheit um das Peptid L-Pro-L-Phe-L-Glu(OH)-OMe.

12. L-Phenylalanyl-L-prolyl-L-pyroglutaminsäureamid

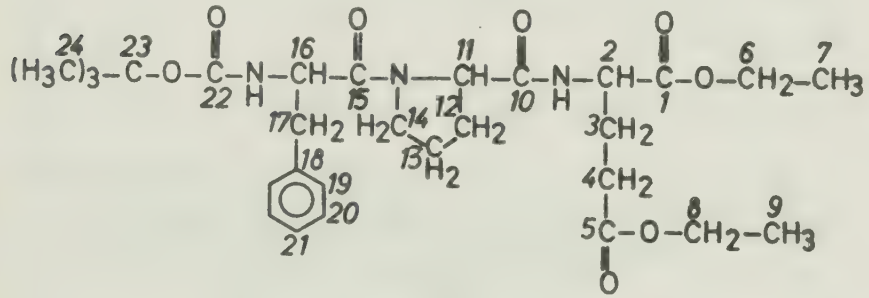
Die entsprechenden Stellungsisomere mit mittelständigem Prolin werden analog synthetisiert. Sie werden deshalb nur in der Symbolschreibweise mit Angabe der physikalischen und spektroskopischen Daten aufgeführt.

Boc-L-Phe-L-Pro-L-Glu(OMe)-OMe ($C_{26}H_{37}N_3O_8$/519,59)

Ansatz:16 mmol; Ausbeute: 5,2 g (62,6 % d.Th.) Öl.
$[\alpha]_D^{25}$ = -29,83° (c= o,59/DMF).

Boc-L-Phe-L-Pro-L-Glu(OEt)-OEt ($C_{28}H_{41}N_3O_8$/547,64)

Ansatz: 16 mmol; Ausbeute: 6,4 g (73,1 % d.Th.) Öl.
$[\alpha]_D^{25}$ = -3o,15° (c=2,o3/DMF).



C 1 = 172,oo; C 2 = 55,9o; C 3 = 26,54; C 4 = 3o,79;
C 5 = 172,37; C 6 = 6o,o5; C 7 = 14,o3; C 8 = 6o,66;
C 9 = 14,o3; C1o =171,64; C11 = 59,44; C12 = 29,94;
C13 = 24,4o; C14 = 46,94; C15 =17o,67; C16 = 53,91;
C17 = 35,76; C18 =138,25; C19 =129,5o; C2o =128,17;
C21 = 126,35; C22 =155,49; C23 = 78,14; C24 = 28,12.

Fig. 31: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Boc-L-Phe-L-Pro-L-Glu(OEt)-OEt.

Der Cyclisierungsversuch der beiden Diester wurde, wie bereits beschrieben, mit gleichen Mengen durchgeführt. Während der Diäthylester nahezu quantitativ das Diamid lieferte, ließ sich beim Dimethylester zusätzlich die Ver-

bindung L-Phe-L-Pro-L-Isogln-OMe nachweisen. Außerdem wurde L-Phe-L-Pro-L-Gln-NH_2 und L-Phe-L-Pro-L-Gln-OMe gefunden.

Boc-L-Phe-L-Pro-L-Isogln-OMe ($C_{25}H_{36}N_4O_7$/5o4,58)

Ansatz: 2,54 mmol; Ausbeute: 81o mg (63,3 % d.Th.); Fp: ab 59° unter Zers.; $[\alpha]_D^{25}$ = -29,9o° (c=o,97/DMF).

Elementaranalyse

ber: C = 59,51 % H = 7,19 % N = 11,1o %

gef: C = 59,o3 % H = 7,11 % N = 1o,7o %.

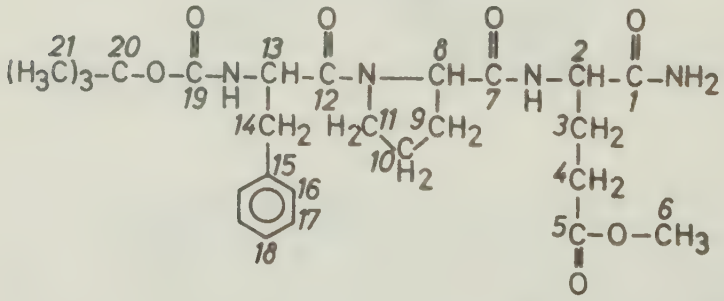
Boc-L-Phe-L-Pro-L-Gln-NH_2 ($C_{24}H_{35}N_5O_6$/489,57)

Ansatz: 1,1 mmol; Ausbeute: 41o mg (75,9 % d.Th.); Fp: 126-131°; $[\alpha]_D^{25}$ = -29,69 ° (c=o,96/DMF).

Elementaranalyse

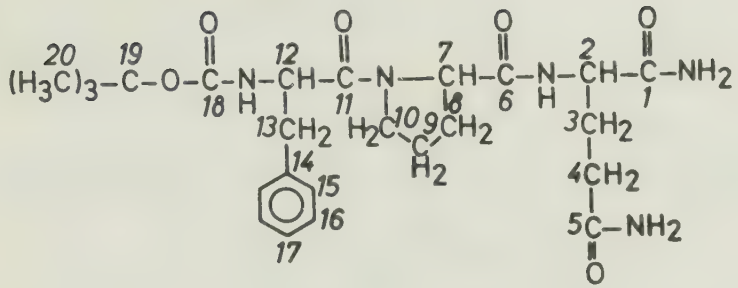
ber: C = 58,88 % H = 7,21 % N = 14,31 %

gef: C = 55,17 % H = 7,o5 % N = 13,38 %



C 1 = 171,58; C 2 = 53,98; C 3 = 27,27; C 4 = 3o,oo; C 5 = 173,o9; C 6 = 51,37; C 7 =17o,97; C 8 = 59,99; C 9 = 28,9o; C1o = 24,72; C11 = 46,87; C12 =17o,48; C13 = 51,67; C14 = 36,86; C15 =138,18; C16 =129,44; C17 = 128,17; C18 =126,35; C19 =155,43; C2o = 78,14; C21 = 28,18.

Fig. 32: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Boc-L-Phe-L-Pro-L-Isogln-OMe.

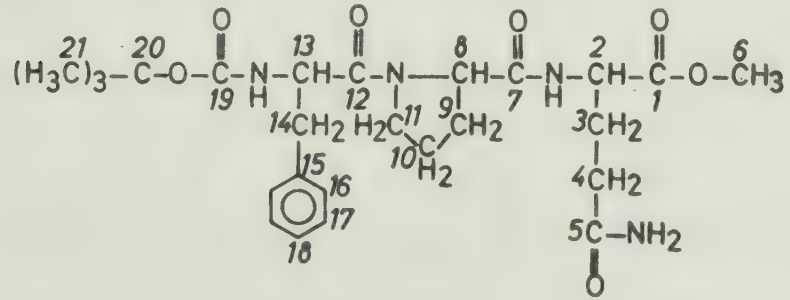


C 1 = 173,52; C 2 = 53,98; C 3 = 28,oo; C 4 = 31,64;
C 5 = 174,43; C 6 =171,58; C 7 = 6o,29; C 8 = 31,15;
C 9 = 24,72; C1o = 46,45; C11 =171,27; C12 = 52,46;
C13 = liegt im DMSO-Peak; C 14 = 138,37; C 15 = 129,5o;
C 16 = 128,23; C 17 = 126,35; C 18 C 155,55; C 19 =
78,2o; C 2o = 28,24.

Fig. 33: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Boc-L-Phe-L-Pro-L-Gln-NH_2.

Boc-L-Phe-L-Pro-L-Gln-OMe ($C_{25}H_{36}N_4O_7$/5o4,58)

Ansatz: 5,5 mmol; Ausbeute: 2,1 g (75,5 % d.Th.) Fp: ab 7o° unter Zers.; $[\alpha]_D^{25}$ = -32,o8° (c=1,3/DMF).
Elementaranalyse
ber: C = 59,51 % H = 7,19 % N = 11,1o %
gef: C = 58,66 % H = 7,94 % N = 1o,45 %



C 1 = 172,61; C 2 = 53,86; C 3 = 26,91; C 4 = 31,28
C 5 = 173,82; C 6 = 51,91; C 7 = 172,49; C 8 = 59,45;
C 9 = 29,21; C 1O = 24,72; C 11 = 46,7O; C 12 = 17O,67;

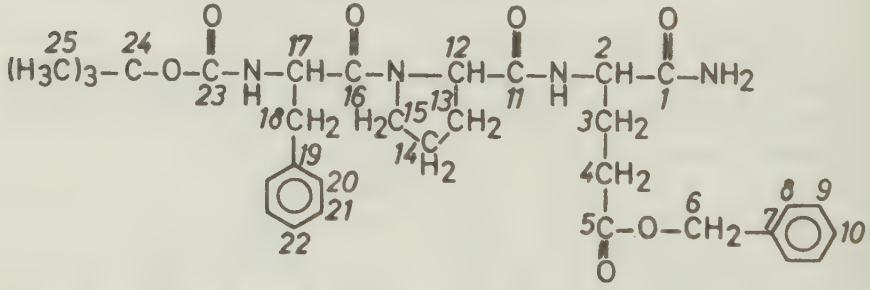
C 13 = 51,91; C 14 = liegt im DMSO-Peak; C 15 = 138,37;
C 16 = 129,50; C 17 = 128,29; C 18 = 126,47; C 19 = 155,49;
C 20 = 78,26; C 21 = 28,24.

Fig. 34: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Boc-L-Phe-L-Pro-L-Gln-OMe.

Die Synthese von Boc-L-Phe-L-Pro-L-Isogln-OMe ist bereits beschrieben worden; der Cyclisierungsversuch lieferte nur das Diamid.

Boc-L-Phe-L-Pro-L-Isogln-OBzl, ($C_{31}H_{40}N_4O_7$/580,68)

Ansatz: 2,6 mmol; Ausbeute: 950mg (62,91% d.Th.); Fp: ab 66° unter Zers; $[\alpha]_D^{25}$ = -30,08° (c=1,25/DMF).
Elementaranalyse
ber: C = 64,12 % H = 6,94 % N = 9,65 %
gef: C = 63,72 % H = 7,37 % N = 10,04%
Die Cyclisierungsversuche mit Fluorwasserstoff oder Trifluoressigsäure verliefen negativ.

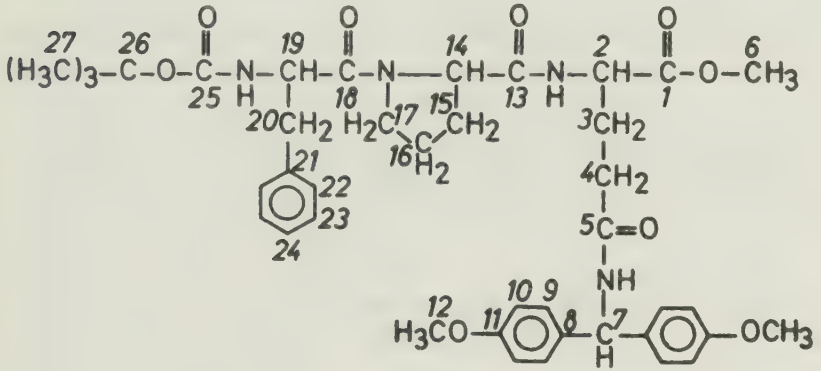


C 1 = 173,09; C 2 = 53,34; C 3 = 26,90; C 4 = 31,66;
C 5 = 173,74; C 6 = 64,18; C 7 = 138,19; C 11 = 172,44;
C 12 = 58,76; C 13 = 30,95; C 14 = 24,26; C 15 = 46,42;
C 16 = 171,60; C 17 = 50,69; C 18 = liegt unter DMSO-Peak;
C 19 = 136,24; C 23 = 155,48; C 24 = 78,07; C 25 = 28,22;
C 8; 9; 10; 20; 21; 22 = 129,48; 128,12; 127,40; 126,43;

Fig. 35: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Boc-L-Phe-L-Pro-L-Isogln-OBzl.

Boc-L-Phe-L-Pro-L-Gln(Mbh)-OMe, ($C_{40}H_{50}N_4O_9$/730,86)

Ansatz: 3 mmol; Ausbeute: 1,2g (54,8% d.Th.); Fp: 134-141°; $[\alpha]_D^{25}$= -23,71° (c=1,05/DMF).

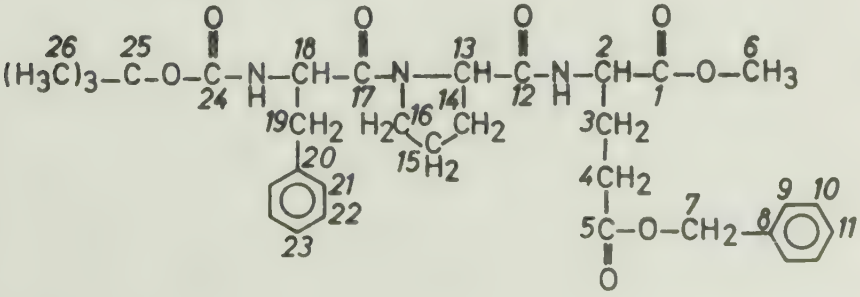


C 1 = 172,24; C 2 = 53,73; C 3 = 27,04; C 4 = 31,77;
C 5 = 171,63; C 6 = 51,17; C 7 = 48,60; C 8 = 135,24;
C 10 = 113,77; C 11 = 158,29; C 12 = 55,18; C 13 = 171,03;
C 14 = 59,67; C 15 = 27,28; C 16 = 23,52; C 17 = 46,28;
C 18 = 170,54; C 19 = 52,03; C 20 = 37,33; C 21 = 138,12;
C 25 = 154,37; C 9; 22; 23; 24 = 129,42; 128,44; 128,09;
126,39.

Fig. 36: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Boc-L-Phe-L-Pro-L-Gln(Mbh)-OMe.

Boc-L-Phe-L-Pro-L-Glu(OBzl)-OMe, ($C_{32}H_{41}N_3O_8$/595,69)

Ansatz: 3,28 mmol; Ausbeute: 1,26 (64,6% d.Th.)



C 1 = 172,18; C 2 = 53,92; C 3 = 26,29; C 4 = 29,88;
C 5 = 172,30; C 6 = 51,12; C 7 = 65,63; C 8 = 138,25;
C 12 = 172,18; C 13 = 59,38; C 14 = 28,96; C 15 = 24,59;
C 16 = 46,75; C 17 = 170,48; C 18 = 51,97; C 19 = liegt unter
DMSO-Peak; C 20 = 136,30; C 24 = 155,43; C 25 = 78,14;
C 26 = 28,18; C 9; 10; 11; 21; 22; 23 = 129,44; 128,71;
128,17; 128,05; 126,71; 126,59; 126,35.

Fig. 37: ^{13}C-NMR-ppm-Werte von Boc-L-Phe-L-Pro-L-Glu(OBzl)-OMe.

Die Cyclisierungsversuche mit beiden Verbindungen lieferten nicht die gewünschten Pyroglutamylpeptide.

IV. Zusammenfassung

Viele Hypothalamus-Peptidhormone enthalten N-terminal einen Pyroglutaminsäurerest. Im Zusammenhang mit Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen sind besonders beim Thyreotropin-freisetzenden Hormon Sequenzen mit mittelständigem bzw. C-terminalem Pyroglutaminsäurerest interessant. Da die klassische Darstellung von derartigen Peptiden in der Literatur bisher noch nicht beschrieben worden ist, wurden Möglichkeiten zur Synthese solcher Verbindungen untersucht.
Am Phe^2-TRH und an der Sequenz L-Pyr-L-Pro-L-Phe-NH_2 wurden optimale Kupplungsvarianten erarbeitet. Dabei lieferten die DCC/HOBt- und die 'Mixed-Anhydrid'-Methode nicht nur im Hinblick auf Ausbeuten sondern auch auf optische Reinheit der Verbindungen die besten Ergebnisse, wie ^{13}C-NMR-spektroskopisch und durch Drehwerte gezeigt werden konnte.

Bei der Anwendung beider Kupplungsmethoden zur Synthese der Peptide L-Phe-L-Pyr-L-Pro-NH_2, L-Pro-L-Pyr-L-Phe-NH_2, L-Phe-L-Pro-L-Pyr-NH_2 und L-Pro-L-Phe-L-Pyr-NH_2 stellte sich jedoch heraus, daß der Lactamstickstoff der Pyroglutaminsäure infolge der Nachbarschaft der Carbonylfunktion seine aminolytischen Eigenschaften eingebüßt hat. Selbst drastischere Kupplungsbedingungen - z.B. 2,4,5-Trichlorphenylester mit HOBt-Katalyse oder Einsatz eines Säurechlorids - führten nicht zu den gewünschten Pyroglutamylpeptiden.

Deshalb wurden zunächst Strukturanaloga hergestellt, welche Glutamin bzw. Glutaminsäure in geschützter Form enthalten. Durch nachträgliche Behandlung mit Ammoniak, Fluorwasserstoff oder Trifluoressigsäure sollte der Ringschluß zur Pyroglutaminsäure erreicht werden.
Bei Behandlung mit konzentriertem oder flüssigem Ammoniak ließen sich neben den Ausgangsverbindungen immer nur die entsprechenden Amide, Diamide oder Ester-Amide nachweisen. Dabei fiel auf, daß die Äthylester nahezu quantitativ das Amid bzw. Diamid bildeten, während dies bei den Methylestern in weit geringerem Maße der Fall war.

Die Kombination saurer und ammoniakalischer Bedingungen erbrachte ebenfalls nicht das gewünschte Resultat; erst nach Einwirken von flüssigem Fluorwasserstoff bei Raumtemperatur

oder kochender Trifluoressigsäure ließen sich die Peptide L-Phe-L-Pyr-L-Pro-NH_2 und L-Pro-L-Phe-L-Pyr-NH_2 isolieren und spektroskopisch charakterisieren. Die analogen Verbindungen, bei denen Prolin über seinen CO-Rest an den Lactamstickstoff der Pyroglutaminsäure gebunden ist, wurden nicht nachgewiesen, was auf eine sterische Hinderung schließen läßt.

Literaturverzeichnis

1) A.V.Schally, A.J.Kastin und A.Arimura, Fertility and Sterility 22, 7o3 (1971)

2) R.Burgus, M.Butcher, N.Ling, M.Monaham, J.Rivier, R.Tellows, M.Amoss, R.Blackwell, W.Vale und R.Guillemin, C.R. Acad.Sci.(Paris) D 273, 1611 (1971)

3) A.J.Prange, I.C.Wilson, P.P.Lara, J.F.Wilber, G.B.Breese, L.B.Alltrop, M.A.Lipton und C.Hill, Arch.Gen.Psychiatry 29, 28 (1973)

4) M.Otsuki, M.Mori, S.Baba und N.Hiroshige, Acta Endocrinol. 73, 233 (1973)

5) J.B.Martin und S.Reichlin, Endocrinology 9o, 1o15 (1974)

6) C.A.Blake, Endocrinology 94, 5o3 (1974)

7) C.M.Baugh, C.L.Krumdieck, J.M.Hershman und J.A.Pittman, Endocrinology 87, 1o15 (197o)

8) C.Rivier und W.Vale, Endocrinology 95, 978 (1974)

9) Kuew-Hsiung Lu, C.J.Shaar, K.H.Kortright und J.Meites, Endocrinology 91, 154o (1972)

1o) P.A.Kelly, K.N.Bedirian, R.D.Baker und H.G.Friesen, Endocrinology 92, 1289 (1973)

11) L.R.Fell, J.K.Findley, I.A.Cumming und J.R.Goding, Endocrinology 93, 487 (1973)

12) H.J.Chen und J.Meites, Endocrinology 96, 1o (1975)

13) M.R.Brown und G.A.Hedge, Endocrinology 91, 2o6 (1972)

14) Y.Kato, K.Chihara, K.Maeda, S.Ohgo, Y.Okanishi und H.Imura, Endocrinology 96, 1114 (1975)

15) M.Brown und W.Vale, Endocrinology 97, 1151 (1975)

16) D.Gupta und W.Voelter, Hypothalamic Hormones - Structure, Synthesis and Biological Activity, Verlag Chemie, D-694o Weinheim, 1975

17) H.Sievertson, J.-K.Chang, K.Folkers und C.Y.Bowers, J. Med.Chem.15, 219 (1972)

18) Yu.P.Shvachkin und A.P.Smirnova, J.Gen.Chem.USSR 43, 686 (1973)

19) H.Horn, Institut für Organische Chemie, Universität Tübingen, Diplomarbeit 1974

2o) Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Synthese von Peptiden II, S.184, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1974

21) E.Fischer, Chem.Ber.36, 2o94 (19o3)

22) Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Synthese von Peptiden II, S.356, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1974

23) M.Frankel, Y.Liwschitz und A.Zilkha, J.Am.Chem.Soc.76, 2814 (1954)

24) E.Pacsu und E.J.Wilson, J.Org.Chem.7, 117 (1942)

25) Th. Curtius, Chem.Ber.35, 3226 (1902)

26) M.A.Nyman und R.M.Herbst, J.Org.Chem.15, 108 (1950)

27) Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Synthese von Peptiden II, S.296 ff, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1974

28) Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Synthese von Peptiden II, S.171 ff, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1974

29) T.Wieland und H.Bernhard, Ann.Chem.572, 190 (1951)

30) J.R.Vaughan, J.Am.Chem.Soc. 73, 3547 (1951)

31) G.W.Anderson, J.E.Zimmerman and F.M.Callahan, J.Am. Chem.Soc.89, 5012 (1967)

32) M.Bodanszky, M.Szelke, E.Tömörkény und E.Weisz, Chem. and Ind.(London) 1517 (1955)

33) J.Pless und R.A.Boissonnas, Helv.Chim.Acta 46, 1609 (1963)

34) J.Kovacs, M.C., Carpini, C.A.Dupraz und G.N.Schmit, J.Org.Chem.32, 3696 (1967)

35) G.W.Anderson, J.F.Zimmerman und F.M.Callahan, J.Am.Chem.Soc. 85, 3039 (1963)

36) J.C.Sheehan und G.P.Hess, J.Am.Chem.Soc.77, 1067 (1955)

37) F.Weygand, D.Hoffmann und E.Wünsch, Z.Naturforsch. 21b, 426 (1966)

38) W.König und R.Geiger, Chem.Ber. 103, 788 (1970)

39) G.A.Fletcher und J.H.Jones, Int.J.Peptide Protein Res.4, 347 (1972)

40) M.Bergmann und L.Zervas, Chem.Ber.65, 1192 (1932)

41) L.A.Carpino und C.A.Giza, J.Am.Chem.Soc.81, 955 (1955)

42) Th.Zincke, Ann.Chem.391, 63 (1912)

43) Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Synthese von Peptiden II, S. 223 ff, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1974

44) W.König und R.Geiger, Chem.Ber. 105, 2872 (1972)

45) W.König und R.Geiger, Chem.Ber. 106, 3626 (1973)

46) K.Folkers, Intra-Sci.Chem.Rep. 5, 263 (1971)

47) Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Synthese von Peptiden I, S. 454, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1974

48) E.Klieger, H.Gibian, Ann.Chem. 649, 183 (1961)

49) Günzler/Böck, IR-Spektroskopie, Eine Einführung, taschentext 43/44; Verlag Chemie, D-6940 Weinheim, 1975

50) E.Schnabel, Ann.Chem.702, 188 (1967)

51) E.Schröder und E.Klieger, Ann.Chem.673, 196 (1974)

52) K.Hofmann, et al., J.Am.Chem.Soc.87, 62o (1965)

53) G.W.Anderson und A.C.McGregor, J.Am.Chem.Soc.79, 4686 (1957)

54) Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Synthese von Peptiden I, S. 66-68, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1974

55) R.A.Fahung, A.Niederwieser, G.Patzki und M.Brenner, Helv.Chim.Acta 44, 2o22 (1961)

56) A.R.Patton und P.Chism, Ann.Chem.23, 1683 (1951)

57) G.Patzki, J.Chromatography 12,541 (1963)

58) R.A.Boissonnas et al., Helv.Chim.Acta 38, 1491 (1955)

59) W.E.Hauby, S.G.Wally und J.Watson, J.Chem.Soc.195o, 3239

6o) B.Hegedüs, Helv.Chim.Acta 31, 737 (1948)

61) St.Guttmann und R.A.Boissonnas, Helv.Chim.Acta 41, 1852 (1958)

62) Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Synthese von Peptiden I, S. 647, Georg Theiem Verlag, Stuttgart, 1974

63) E.Fischer und R.Boehner, Chem.Ber. 44, 1332 (1911)

64) M.Goodman et al., J.Am.Chem.Soc.84, 1283 (1962)

65) H.Gibian und E.Klieger, Ann.Chem.64o, 145 (1961)

66) W.J.LeQuesne und G.T.Young, J.Chem.Soc.(London), 195o (1954)

67) E.Klieger und H.Gibian, Ann.Chem.655, 195 (1962)

68) C.R.Harington und R.C.G.Moggridge, J.Chem.Soc.194o, 7o6

69) U.Weber, Z.Naturforsch. 31b, 1157 (1976)

7o) E.Sondheimer und R.W.Holley, J.Am.Chem.Soc.76, 2467 (1954)

71) N.A.Poddubuaya, G.N.Balandina und O.A.Tambieva, J.Gen.Chem.USSR 41, 428 (1971)

72) W.König und R.Geiger, Chem.Ber. 1o3, 2o41 (197o)

73) L.Zervas, D.Borovas, E.Gazis, J.Am.Chem.Soc.85, 366o (1963)

74) Ch.Meyers, R.T.Havran, J.L.Schwarz, W.R.Walter, Chemistry and Industry, Feb. 1969, 136

75) S.Viser et al., Recueil 89, 865 (197o)

76) J.M.Swan und V.du Vigneaud, J.Am.Chem.Soc.76, 311o (1954)

77) M.Bergmann und L.Zervas, Chem.Ber. 65ß, 1192 (1932)

78) Ch.Ressler, J.Am.Chem.Soc.82, 1641 (1960)

79) P.Lefrancier und E.Bricas, Bl.Soc.Chim.biol.49, 1257 (1967)

80) P. Kurath und A.M. Thomas, Helv. Chim. Acta 56,1636 (1973)

81) R.B. Angier et al., J.Am. Chem. Soc. 72, 74 (1950)

82) J.C. Anderson et al., J. Chem. Soc. (C), 1961, 108

83) R.A. Boissonnas et al., Helv. Chim. Acta 39, 1421 (1965)

84) H. Schwarz et al., J. Am. Chem. Soc. 79, 5697 (1957)

85) H. Grüb, Synthese von Gastrinteilsequenzen nach der Festkörpermethode, Dissertation, Tübingen 1971, Chemisches Institut

86) B.F. Erlanger, H. Sachs und E. Brand, J. Am. Chem. Soc. 76, 1806 (1954)

87) W. Broadbent, J.S. Morley und B.E. Stone, J. Chem. Soc. (C) 1967, 2632

88) H. Kalbacher, Synthesen, Strukturuntersuchungen und Aktivitäten C-Terminal Veränderter Derivate des TRH, Diplomarbeit, Tübingen 1975, Chemisches Institut

89) R.W. Chambers und F.H. Carpenter, J. Am. Chem. Soc. 77 1522 (1955)

90) D. Hammer und J.P. Greenstein, J. biol. Chem. 193, 81 (1951)

91) P. Anderson, J. Org. Chem. 27, 2094 (1962)

92) M. Bergmann et al., Hoppe-Seyler's Z. f. Physiol. Chem. 224, 34 (1934)

Lebenslauf

Name	: Pietrzik, Emanuel
Geburtstag, -ort	: 2o.11.1948, Dresden
Eltern	: Pietrzik, Sylvester und Pietrzik, Ruth (geb. Hartlieb)
Staatsangehörigkeit	: deutsch
Schulbesuch	
1955 - 1959/6o	: Volksschule Eintrachtstraße,Solingen
196o - 1968	: Gymnasium Schwertstraße,Solingen
Studium	
1968 - 1973	: Eberhard-Karls-Universität,Tübingen. Bis zum Vordiplom Studium der Biologie, bis zum Diplom Studium der biochemisch ausgerichteten Fachkombination Mikrobiologie, Biochemie, Organische Chemie und Genetik (Molekularbiologie)
8. Juni 1973	: Eheschließung mit Fräulein Marie-Luise Rempfer, Studienreferendarin, aus Öschingen
Diplom	: 6.12.1973 Die Diplomarbeit wurde am Max-Planck-Institut für Virusforschung, Abteilung Prof.Dr.W.Schäfer, unter Anleitung von Dr. H.Frank durchgeführt
Februar 1974	: Beginn der Dissertation am Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl für Organische Chemie I, unter Anleitung von Prof.Dr.W.Voelter
Sommersemester 1974	: Beginn mit dem Zweitstudium in Chemie, Ziel: Diplom
4.Mai 1975	: Geburt unseres Sohnes Nikolas

Bisher waren meine akademischen Lehrer die Professoren:

E.Bünning, H.Diekmann, H.Frank, K.G.Grell, J.Guglielmi, W.Harder, U.Henning, H.Jockusch, R.Knippers, W.Löffler, K.Mägdefrau, G.F.Meyer, G.Mickoleit, F.P.Möhres, E.Sander, S.Sarkar, W.Schäfer, U.Schwarz, B.Schwemmle, W.Seyffert, D.Sperlich, G.Weitzel, U.Weser, K.Wöhrmann, H.Zähner (Biologie und Biochemie)

E.Bayer, W.Braun, M.Hanack, W.Krauß, D.Krug, U.Kunze, E.Lindner, E.Mauser, E.Müller, H.Oberhammer, D.Oelkrug, G.Opitz, S.Kemmler-Sack, A.Rieker, W.Rüdorff, W.Rundel, F.F.Seelig, H.Stegmann, H.Suhr, W.Voelter, W.Zeil (Chemie)

M. Brendle, H.Krüger, H.Seiler (Physik)

difo-druck · 8600 bamberg